

DAS BMP- NETZWERK IN DISSEMINIERTEN ZELLEN VON MAMMAKARZINOMEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich
Schiller Universität Jena

Von Annika Maria Voigt, geb. Veenker
Geboren am 30.06.1982 in Haselünne

GUTACHTER

1. Prof. Dr. K. Höffken, Jena
2. PD Dr. F. von Eggeling, Jena
3. PD Dr. W. Vogel, Tübingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.02.2009

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
4x-XT-SB	4x-XT- Sample Buffer
A	Ampère
AIDA	Advanced image data analyzer
BMP	Knochenwachstumsfaktor (bone morphogenetic protein)
BMPR-II	BMP- Rezeptor- Typ 2
bp	Basenpaare
CD45	Cluster of Differentiation 45 (Oberflächenantigen von Leukozyten)
cDNA	complementary DNA
DCIS	Carcinoma ductale in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer Location 4 (= Smad4)
DT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
G	Tumor- Grading
Ges.	Gesunde Probandinnen
HEA	Humanes epitheliales Antigen
ICC	Immuncytochemie
kDa	Kilo- Dalton (Einheit für Proteingröße)
LAS	Luminescent Image Analyser
LCIS	Carcinoma lobulare in situ
LSC	Laser Scanning Zytometer
MACS	Magnetic adsorbent Cell Separation
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
NTP- Mix	Nucleosidtriphosphat- Mix

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
Pat.	Patientinnen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE- Puffer	Phosphat- EDTA- Puffer
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT- PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS- Page	Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamid- Gelelektrophorese
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TGF	Transforming growth factor
u. a.	unter anderem
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG.....	8
1.1. MAMMAKARZINOM	8
1.2. BMP2.....	10
1.3. BMPR-II	11
1.4. SMAD4.....	12
1.5. ZUSAMMENFASSUNG SIGNALTRANSDUKTION	13
1.6. BETA- AKTIN	14
1.7. CYTOKERATIN 19	15
1.8. HORMONREZEPTOREN UND HER2/NEU	16
2. ZIELE DER ARBEIT	17
3. MATERIALIEN UND METHODEN.....	18
3.1. MATERIALIEN	18
3.1.1. Peripheres Blut.....	18
3.2. GEWINNUNG DER WEIßEN BLUTKÖRPERCHEN UND DER TUMORZELLEN AUS DEM EDTA- BLUT.....	19
3.3. ZELLSEPARATION MIT MACS.....	20
3.4. ZELLZAHLBESTIMMUNG	21
3.5. ZELLUNTERSUCHUNG MIT DEM LSC.....	22
3.6. RNA- UNTERSUCHUNGEN	23
3.6.1. RNA-Isolierung	23
3.6.2. Bestimmung der RNA- Konzentration	23
3.6.3. cDNA- Synthese.....	24
3.6.4. Real- time- RT- PCR	25
3.6.5. Agarose- Gelelektrophorese.....	29
3.7. PROTEIN- UNTERSUCHUNGEN.....	30
3.7.1. Protein- Isolierung	30
3.7.2. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- Page).....	30
3.7.3. Western Blot.....	32
3.7.4. Auswertung am LAS und mit AIDA	34
3.8. STATISTIK	34
4. ERGEBNISSE.....	37
4.1. ERGEBNISSE DER ZELLSEPARATION.....	37
4.2. VERGLEICHSWERT AKTINKONZENTRATION ODER ZELLZAHL.....	39
4.3. ERGEBNISSE DER RNA- ANALYSE.....	40
4.3.1. Auswertung der absoluten RNA- Konzentrationen der Patientinnen	41
4.3.2. Auswertung der relativen RNA- Konzentrationen der Patientinnen	42

4.3.3.	Auswertung der absoluten und relativen RNA- Konzentrationen der gesunden Probandinnen....	43
4.3.4.	Vergleich der RNA- Konzentrationen von Patientinnen und Probandinnen.....	45
4.3.5.	Statistische Auswertung der RNA- Ergebnisse.....	48
4.4.	ERGEBNISSE DER PROTEIN- ANALYSE	51
4.4.1.	Auswertung der absoluten Protein- Konzentrationen der Patientinnen.....	52
4.4.2.	Auswertung der relativen Protein- Konzentrationen der Patientinnen.....	53
4.4.3.	Auswertung der absoluten und relativen Protein- Konzentrationen der gesunden Probandinnen	54
4.4.4.	Vergleich der Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Probandinnen.....	56
4.4.5.	Statistische Auswertung der Protein- Ergebnisse	59
4.5.	VERGLEICH DER RNA- UND PROTEINKONZENTRATIONEN.....	62
4.6.	ERGEBNISSE DER AUSWERTUNG DES HORMONREZEPTOR- STATUS UND DES HER2/NEU- STATUS	63
5.	DISKUSSION	65
6.	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	77
	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	78
	ANHANG.....	84
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	84
	TABELLENVERZEICHNIS	84
	FORMEL- VERZEICHNIS.....	86
	DIAGRAMM- VERZEICHNIS.....	86
	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN MATERIALIEN	88
	<i>Zellseparation.....</i>	<i>88</i>
	<i>LSC</i>	<i>88</i>
	<i>Zellzahlbestimmung.....</i>	<i>88</i>
	<i>RNA- Isolierung.....</i>	<i>88</i>
	<i>Konzentrationsbestimmung von RNA</i>	<i>89</i>
	<i>cDNA- Synthese</i>	<i>89</i>
	<i>Real Time PCR (Light Cycler).....</i>	<i>89</i>
	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	<i>90</i>
	<i>Proteinisolierung.....</i>	<i>90</i>
	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	<i>90</i>
	<i>SDS- Page.....</i>	<i>90</i>
	<i>Western Blot</i>	<i>91</i>
	<i>Auswertung des Blots</i>	<i>91</i>
	<i>Statistik.....</i>	<i>91</i>
	LÖSUNGEN	92
	DANKSAGUNG.....	94
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	95
	LEBENS LAUF	96

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. In der Tumorgenese erlangen die Zellen durch Mutationen die Fähigkeit, sich aus dem soliden Gewebeverbund zu lösen und in das Gefäßsystem einzudringen. Dabei spielen Knochenmorphogenesefaktoren eine Rolle. In dieser Arbeit sollten im Blut zirkulierende, so genannte disseminierte Tumorzellen, auf vier Proteine untersucht werden: den Differenzierungsfaktor BMP2, den membranständigen Rezeptor BMPRII, das intrazelluläre Signalprotein Smad4 und als etablierten Marker für epitheliale Zellen CK19. Dazu wurden Blutproben von 42 Patientinnen untersucht, 21 auf RNA und 21 auf Proteine, und mit Blutproben von fünf gesunden Probandinnen verglichen. Die Tumorzellen wurden mit magnetischen Nanopartikeln beladen und mittels magnetischer Separation angereichert. Die daraus resultierende Fraktion wurde als Positivfraktion bezeichnet.

Im Vergleich mit den Proben der gesunden Probandinnen wurde in den Patientenproben sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene deutlich mehr CK19 und BMP2 gebildet, sowie weniger Smad4. Außerdem befand sich in der Positivfraktion mehr CK19- und BMP2- RNA sowie weniger Smad4- RNA als in der Negativfraktion. Auf Proteinebene war mehr CK19 und Smad4 in der Negativfraktion zu finden, die BMP2- Konzentrationen waren ausgeglichen. Diese Ergebnisse stützen die These, dass Brustkrebszellen vermehrt CK19 als epithelialen Marker und BMP2, beteiligt an Invasion und Migration, exprimieren. Weiterhin konnte die in der Literatur beschriebene Rolle von Smad4 als Tumorsuppressor bestätigt werden. Hier liegt nach den vorgelegten Ergebnissen kein Unterschied zwischen soliden Tumoren und disseminierten Zellen vor. Anhand klinischer Patientendaten wurde der Hormonrezeptorstatus ausgewertet und mit den erhobenen eigenen Daten in Beziehung gesetzt. Dabei ergab sich, dass bei hohen Konzentrationen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren weniger BMP2 und mehr Smad4 gebildet wurden. Bei hohem Her2/neu- Status wurde mehr CK19 und weniger Smad4 gebildet. Auch dadurch konnten die oben genannten Funktionen von CK19, BMP2 und Smad4 in der Tumorgenese bestätigt werden.

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebsart bei Frauen in Deutschland. Das Lebenszeitrisko, zu erkranken, liegt bei 9,2% (Robert- Koch- Institut 2005). Es treten in Deutschland jährlich ca. 47500 Neuerkrankungen auf. 40% der Frauen sind bei Erstdiagnose jünger als 60 Jahre. Insgesamt liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 67 Jahren. Obwohl die Inzidenz steigt, ist die Mortalität aufgrund der besseren Vorsorge und der sich weiterentwickelnden Therapiemöglichkeiten seit 1997 rückläufig (Robert- Koch- Institut 2005).

Für das Mammakarzinom gibt es eine Reihe von Risikofaktoren: Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft und Sozialstatus, frühe Menarche, späte Menopause, Hormonersatztherapie in der Menopause sowie Nulliparität oder Schwangerschaften erst nach dem 35. Lebensjahr, weiterhin Adipositas, regelmäßiger Alkoholkonsum, gutartige Brusterkrankungen, Bestrahlungen der Brust, andere Tumoren in der Eigenanamnese sowie erkrankte verwandte Frauen (Robert Koch Institut 2005).

Am Anfang der Tumorgenese steht die Mutation einer einzelnen Zelle, meist an der Übergangszone vom Ductus zum Azinus. Diese Zelle proliferiert und es entsteht zunächst ein Carcinoma duktales oder lobuläres in situ. Dieses hat die Lamina muscularis mucosae noch nicht durchbrochen und kann nicht metastasieren. Allerdings entwickeln die Tumorzellen durch weitere genetische Veränderungen die Eigenschaft, invasiv zu wachsen: das invasive duktales oder lobuläre Karzinom ist entstanden (siehe Abbildung 1). Durch das rasante Wachstum des Tumors tritt recht schnell eine Ischämie im Tumorrinneren ein, ein starker Reiz für die Tumorangiogenese. Nach der Gefäßbildung besteht die Möglichkeit, dass Tumorzellen den Gewebeverbund verlassen und in das Gefäßsystem eindringen. Dieser Vorgang wird Intravasation genannt. Die dann im Blut zirkulierenden, sogenannten disseminierten Tumorzellen, können dort über Jahre hinweg inaktiv in der G0- Phase verharren, um irgendwann das Gefäßsystem zu verlassen (Extravasation) und in peripheren Geweben abzusiedeln (Chambers et al. 2002). Das Mammakarzinom metastasiert vor allem in Lunge, Leber, Skelettsystem und Gehirn.

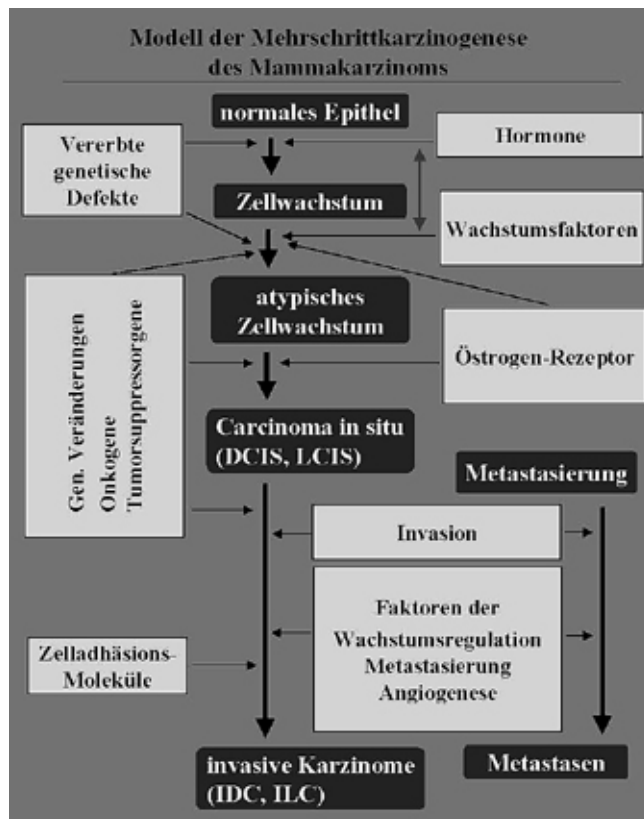


Abbildung 1: Modell der Mehrschrittkarzinogenese des Mammakarzinoms (Beckmann et al. 2000)

Die Klassifikation des Mammakarzinoms ist abhängig vom Stadium seiner Entwicklung. So wird für jeden Tumor der TNM- Status, das UICC- Stadium, das Grading und der Östrogen-, Progesteron- und Her2/neu- Rezeptorstatus bestimmt. Nach diesen Faktoren richtet sich die Therapie, die aus den Säulen der Operation, der Chemotherapie und der Radiatio besteht. Auch die Prognose ist abhängig von den oben genannten Faktoren. Insgesamt liegt die Fünf- Jahres- Überlebensrate bei 76%, allerdings treten Metastasen auch noch nach zehn bis zwölf Jahren auf, so dass die Überlebensrate insgesamt geringer ist. Ein eigenständiger Prognosefaktor ist die Anzahl an disseminierten Tumorzellen im Blut der Patientinnen, die für zukünftige Metastasen verantwortlich sein können (Vincent-Salomon et al. 2007).

Obwohl mehrere Arbeitsgruppen diese disseminierten Zellen untersuchen, sind die molekularen Grundlagen der Intravasation, der Extravasation und der anschließenden Metastasierung weitgehend ungeklärt. In unserer Arbeitsgruppe wird diesbezüglich besonderes Augenmerk auf den Knochenmorphogenesefaktor BMP2 und die Komponenten der Signaltransduktion – u.a. den BMP- Rezeptor Typ II und das Common- Smad Smad4 - gelegt.

1.2. BMP2

BMP2 ist ein Knochenmorphogenesefaktor und Mitglied der BMP- Familie, die wiederum zur TGF β - Superfamilie gehört. Es bildet zusammen mit BMP4 eine Untergruppe der BMP- Familie (siehe Abbildung 2).

Die TGF- β - Superfamilie

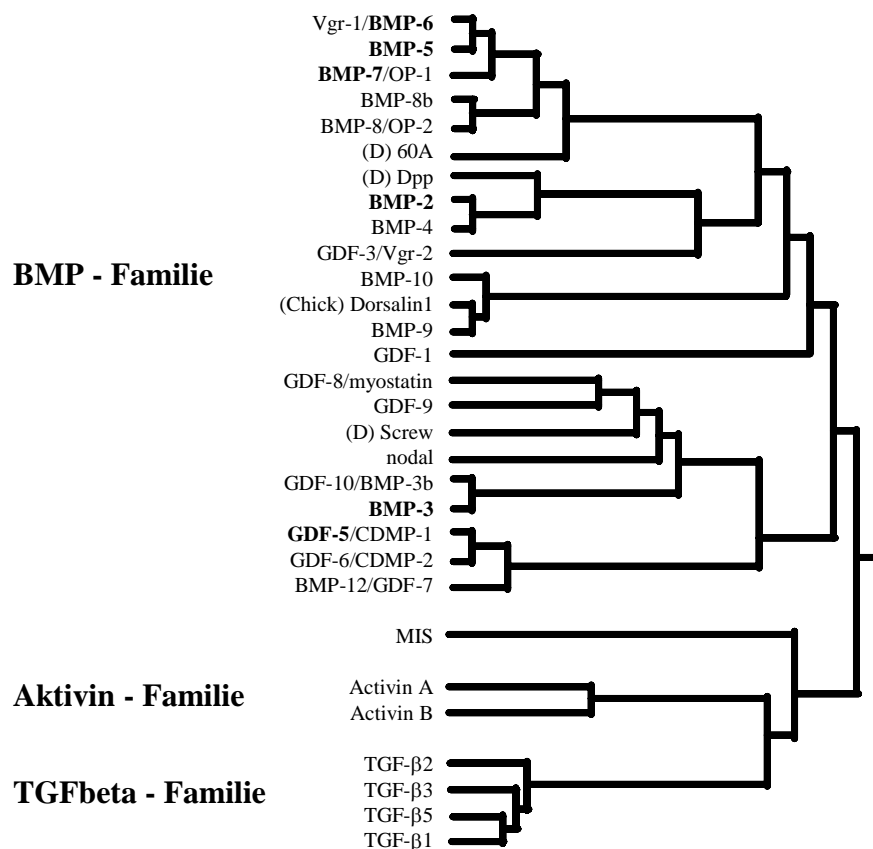


Abbildung 2: Überblick über die TGF- β - Superfamilie. Die fett unterlegten Mitglieder der BMP- Familie werden in unserer Arbeitsgruppe besonders beachtet.

BMP2, ein ca. 45 kDa großes Protein, besteht aus 396 Aminosäuren und wird auf dem Chromosom 20p12 kodiert. Das Gen ist 12,1 kb groß und enthält drei Exons. Die zugehörige mRNA besteht aus 1547 Basenpaaren (www.genatlas.org).

BMP2 hat sowohl im embryonalen als auch im erwachsenen Organismus wichtige Funktionen. In der Embryonalentwicklung ist es u. a. verantwortlich für die Herzentwicklung; fehlt es, kommt es unweigerlich zum Absterben des Embryos (Korchynskyi et al. 2004). Im erwachsenen Organismus ist BMP2 vor allem für das Knochenwachstum und die Regeneration von Knorpel und Knochen wichtig. Es induziert

die Differenzierung von Osteoblasten aus myogenen Zellen und fördert die Osteocalcin- und Kollagen Typ1- Bildung. Damit kommt es bei Anwesenheit von BMP2 zur verstärkten Mineralisierung der Extrazellulärmatrix im Knochen (Canalis et al. 2003).

Im Zuge der Tumorentwicklung spielt BMP2 ebenfalls eine wichtige, wenn auch in der Literatur kontrovers diskutierte Rolle.

Unsere Arbeitsgruppe vertritt die These, dass BMP2 tumorfördernde Wirkungen hat. Es wurde nachgewiesen, dass BMP2 die Id-Gene (Inhibitor of differentiation) hochreguliert (Clement et al. 2005, Raida et al. 2005). Dadurch wird die Mitoseaktivität gefördert und die Apoptoserate gesenkt. Außerdem fördert BMP2 die Migrationsfähigkeit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und es stimuliert den Gefäßwachstumsfaktor VEGF. Somit befähigt es den Tumor dazu, Neoangiogenese zu betreiben (Langenfeld und Langenfeld 2004, Clement et al. 2005).

Im Gegensatz dazu weisen die Arbeitsgruppen Reinholz et al. und Bobinac et al. BMP2 tumorsuppressive Wirkungen zu. Es wird beschrieben, dass BMP2 in Mammakarzinomen und deren Metastasen weniger exprimiert wird als in normalem Brustgewebe: je weniger BMP2, desto aggressiver der Tumor (Reinholz et al. 2002, Bobinac et al. 2005). Außerdem wird beschrieben, dass Östrogene das Krebswachstum fördern, indem sie die suppressive Wirkung von BMP2 hemmen (Yamamoto et al. 2002). Die Arbeitsgruppe Pouliot et al. fand heraus, dass BMP2 die Proliferation von Brustkrebszellen, die Smad1 und Smad4 exprimieren, inhibiert (Pouliot und Labrie 2002).

1.3. BMPR-II

Der BMP- Rezeptor vom Typ 2 ist eine transmembranöse Serin-Threonin-Kinase (Liu et al. 1995, Gilboa et al. 2000). Er besteht aus vier Anteilen, dem hydrophoben extrazellulären N-Terminus, dem transmembranalen Teil, der intrazellulären Kinasedomäne und dem intrazellulären C-Terminus (Hassel et al. 2004). Insgesamt besteht er aus 1038 Aminosäuren und ist 70-80 kDa groß. Kodiert wird er von einer 182,6 kb großen DNA auf dem Chromosom 2q33 – q34. Die mRNA für den BMPR-II beinhaltet 3611 Basenpaare (www.genatlas.com).

Im menschlichen Organismus findet sich der Rezeptor in zahlreichen Geweben wie Lunge, Pankreas und Prostata (Bradley et al. 1995). Eine Mutation führt zu hereditärer

pulmonaler Hypertension. Ein Fehlen des Rezeptors ist schon in sehr frühen Embryonalstadien letal (Hassel et al. 2004).

Der BMPR-II allein ist nicht in der Lage, BMPs zu binden. Erst die Anwesenheit von BMP-Rezeptoren vom Typ 1 führt zu einer BMP-Bindung. Meist liegt der BMPR-II schon als präformierter Komplex mit BMPR-I vor. Spätestens aber bei Bindung von BMP2 an BMPR-IA bildet sich ein Komplex zwischen diesem und dem BMPR-II aus (Gilboa et al. 2000). Der BMPR-I dient dann dem BMPR-II als Substrat und wird phosphoryliert, wodurch die Signalkaskade in Gang gesetzt wird (Liu et al. 1995).

Der BMPR-II interagiert aber nicht nur mit dem BMPR-I, sondern mit insgesamt 33 Proteinen, die unter anderem für die Signaltransduktion, den Aufbau des Zytoskeletts oder den Stoffwechsel der Zelle wichtig sind (Hassel et al. 2004).

Für die Signaltransduktion, die vom BMP-Rezeptor-Typ 2 ausgeht, stehen mehrere Wege zur Verfügung. Zum einen gibt es den Smad- Signalweg (siehe unten), zum anderen kann der BMPR-II die Signale aber auch über den LIM-Kinase- und den MAP-Kinase-Weg weiterleiten (Foletta et al. 2003).

1.4. Smad4

Die Smad- Proteine sind wichtig für die intrazelluläre Übertragung des BMP- Signals. Es sind bisher insgesamt neun verschiedene Smads beschrieben, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Smad1, 2, 3, 5, 8 und 9 sind Rezeptor- regulierte Smads (R-Smads), Smad6 und 7 sind inhibitorische Smads (I- Smads) und Smad4 ist das gemeinsame Smad (C- Smad) (Korchynskyi et al. 2004). Smad1, 5 und 8 sind Bestandteile des BMP- Signals, Smad2 und 3 sind Teile des TGF β und Aktivin- Signalwegs und Smad4 ist Mitglied aller drei Signalkaskaden. Nachdem die Smads1, 2, 3, 5, 8 und 9 von den Typ-1- Rezeptoren phosphoryliert wurden, bilden sie Komplexe mit Smad4, was zur Translokation in den Kern führt.

Alle Smads haben die gleiche Struktur: Sie bestehen aus einer MH1- und einer MH2- Domäne. Die MH1- Domäne bindet an Smad- bindende Elemente (SBE) der DNA. Dies sind GTCT-, GACA- oder GCCG- Motive. Allerdings ist die Affinität von Smads zur DNA recht gering, sodass für die Bindung noch Hilfsproteine wie FAST-1, -2, AP-1, Hoxc-8 und p300 nötig sind. Die MH2- Domäne ist verantwortlich für die Translokation in den Zellkern (Kusanagi et al. 2000).

Smad4 ist ein ca. 60 kDa großes Protein, es besteht aus 552 Aminosäuren, wird kodiert vom Chromosom 18q21.1, von einer ca. 50 kb großen DNA, und die zugehörige mRNA ist 3220 Basenpaare lang (www.genatlas.com).

Gegenüber den anderen Smads hat Smad4 einige Besonderheiten: Es steht nicht in Kontakt mit den Typ-1- Rezeptoren und wird bei Ligandenbindung nicht phosphoryliert. Außerdem ist es ein wenig größer als die anderen Smads (Zhang et al. 1997).

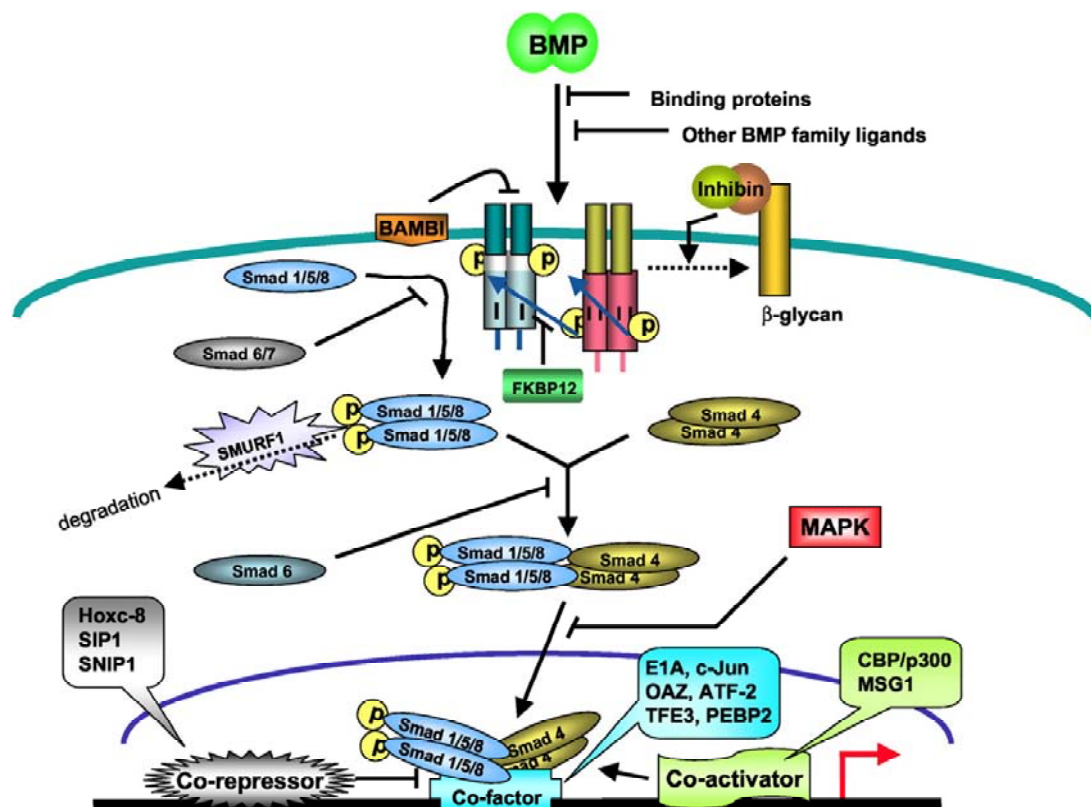
Smad4 gilt als Tumorsuppressor. Es wird auch DPC4 genannt, was für „deleted in pancreatic cancer“ steht. In Pankreas-, Kolon-, und Gallenwegskarzinomen ist Smad4 häufig deletiert. Außerdem induziert es einen Zellzyklusarrest in der G1- Phase, wodurch die Tumorzellproliferation gehemmt wird. Dies alles spricht für die tumorsuppressive Wirkung von Smad4 (Dai et al. 1999).

Beim Mammakarzinom hat Smad4 sowohl tumorhemmende als auch tumorfördernde Wirkungen: Einerseits ist Smad4 in östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen vorhanden und wirkt dort tumorsuppressiv, indem es mit dem Östrogenrezeptor interagiert und somit das östrogeninduzierte Tumorwachstum hemmt (Li et al. 2005). Der Verlust von Smad4 führt außerdem zu mehr Lymphknotenmetastasen (Xie et al. 2002). Andererseits fördert Smad4 aber auch osteolytische Knochenmetastasen des Mammakarzinoms, indem es IL11 hochreguliert, das wiederum Osteoklasten aktiviert (Kang et al. 2005, Deckers et al. 2006).

Abgebaut wird Smad4 über Smurf- Proteine. Dies sind Ubiquitinasen, die vermittelt durch die I-Smads 6 und 7 an Smad4 binden und dieses ubiquitinieren. Danach wird das Smad4 von E3-Ligasen abgebaut (Morén et al. 2005).

1.5. Zusammenfassung Signaltransduktion

BMP2 bindet an den extrazellulären Teil des BMP- Rezeptors vom Typ 1. Dadurch verändert dieser seine Konformation und kann nun an einen BMP- Rezeptor vom Typ 2 binden. Der Rezeptortyp 2 phosphoryliert und aktiviert daraufhin den Typ 1- Rezeptor, der wiederum intrazelluläre R- Smad- Proteine phosphoryliert. Diese aktivierten Smads bilden dann Komplexe mit dem Common- Smad4, wodurch sie die Fähigkeit erlangen, in den Zellkern zu wandern und die Transkription von Zielgenen zu modulieren (siehe Abbildung 3).



Shimazaki et al., 2004
Endocrine Reviews 25: 72-101

Abbildung 3: Schema der Signaltransduktion der BMPs (Shimazaki et al. 2004)

1.6. Beta- Aktin

Beta- Aktin ist ein Housekeeping- Gen; das heißt, es wird in allen Zellen stetig in vergleichbarer Konzentration exprimiert. Es wird nur sehr selten mutiert. Kodiert wird es auf dem Chromosom 7p22, die DNA ist 3,5 kb groß, die zugehörige mRNA ist 1793 Basenpaare lang. Das Beta- Aktin- Protein besteht aus 375 Aminosäuren und ist 42 kDa groß (www.genatlas.com). In der Zelle liegt es im Zytoplasma vor und ist ein wichtiges Strukturprotein des Zytoskeletts.

Aus der relativ großen Auswahl an Housekeeping- Genen wurde für diese Arbeit Beta- Aktin gewählt, weil es verglichen mit anderen Housekeeping- Genen die geringste Variabilität zwischen verschiedenen Brustkrebszelllinien und die geringste zufällige Variabilität zeigt. Außerdem ist die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Beta- Aktin sehr hoch (Morse et al. 2005).

1.7. Cytokeratin 19

Cytokeratin 19 ist ein 44 kDa großes Protein, die DNA liegt auf dem Chromosom 17q21.2 und misst 4,7 kb, die mRNA ist 1407 Basenpaare lang (www.genatlas.com). Es ist Bestandteil jeder epithelialen Zelle. Demzufolge ist es auch in Mammakarzinomzellen, die epithelialen Ursprungs sind, vorhanden. Das wiederum macht Cytokeratin 19 zu einem Hilfsmittel, um disseminierte Tumorzellen des Mammakarzinoms im Blut zu detektieren. Dazu wird entweder die PCR (RT-PCR oder Real-time-PCR am Light-Cycler) oder die Immunocytochemie (ICC) benutzt, wobei die PCR sensitiver ist als die ICC (Statopoulou et al. 2002). Die Detektion der Zellen mittels CK19-PCR ist ein hoch sensitives und spezifisches System. CK19-Zellen werden nur in 2,2% der gesunden Frauen gefunden. Dagegen haben 31% der Patientinnen mit frühen sowie 40-42% derer mit späten Brustkrebsstadien CK19-Zellen im Blut. Allerdings gibt es auch Fehlerquellen bei der CK19-Detektion, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können: Erstens gelangen bei der Venenpunktion Hautzellen ins Blut, die ebenfalls den epithelialen Marker CK19 tragen. Diesem Fehler kann aber dadurch entgegengewirkt werden, dass für Forschungszwecke nicht das zuerst abgenommene Blut benutzt wird. Zweitens gibt es CK19-Pseudogene, die durch die PCR ebenfalls entdeckt werden können und drittens sind sehr geringe Mengen an CK19 auch im Blut von Gesunden vorhanden, die durch die hochsensible PCR-Technik detektiert werden können (Statopoulou et al. 2003).

CK19-Zellen im Blut können als negativer Prognosefaktor bei Brustkrebspatientinnen genutzt werden. Wenn diese Zellen im Blut nachweisbar sind, ist das krankheitsfreie Intervall kürzer und die Überlebenszeit geringer. Dieser Prognosefaktor ist unabhängig von den anderen bekannten Prognosefaktoren für das Mammakarzinom und sogar signifikanter als der Lymphknotenstatus (Statopoulou et al. 2002).

1.8. Hormonrezeptoren und Her2/neu

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus von Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)-Rezeptoren sowie des Her2/neu- Status gehört zur Routineuntersuchung jedes Brustkrebsgewebes (Dillon 2002). Dabei wird ER in 71% der Fälle, PR in 54% und Her2/neu in 30% exprimiert (Spyratos et al. 1989, Chen et al. 2003). Bei ER und PR kommt es dabei auf das Alter der Patientinnen an. Ältere, postmenopausale Patientinnen exprimieren beide Rezeptoren zu einem größeren Prozentsatz als jüngere prämenopausale Patientinnen (Frenay et al. 1991). Der Hormonrezeptorstatus ist ein wichtiger Prognosefaktor, denn Tumoren, die sowohl ER- als auch PR- positiv sind, reagieren besser auf endokrine Therapien und haben längere krankheitsfreie Intervalle als Tumoren, die hormonrezeptornegativ sind (Spyratos et al. 1989, Frenay et al. 1991). Her2/neu- Positivität dagegen verschlechtert die Prognose, fördert Metastasierungen und Resistenzen gegen Tamoxifen und Chemotherapien (Chen et al. 2003). Bei Her2/neu- positiven Tumoren gibt es allerdings die Möglichkeit, mit dem Antikörper Trastuzumab gute Therapie- Ergebnisse zu erzielen.

2. Ziele der Arbeit

Wie oben beschrieben spielen BMPs in der Tumorgenese des Mammakarzinoms eine wesentliche Rolle. Bisher sind in vielen Arbeiten vor allem solide Tumoren der Brust auf Mitglieder des BMP- Netzwerkes untersucht worden. Mit dieser Arbeit sollten nun die vom soliden Tumor ausgeschwemmten disseminierten Zellen ebenfalls auf einige Bestandteile des BMP- Netzwerkes getestet werden. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf BMP2 liegen. Dieser Entscheidung lag zu Grunde, dass in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass BMP2 eine essentielle Rolle in der Brustkrebsentstehung und Entwicklung spielt. Weiterhin wurden der BMP2- Rezeptor BMPR- II und das Common-Smad Smad4 als weitere Bestandteile des BMP- Netzwerkes als Untersuchungsobjekte gewählt.

Des Weiteren wurde der Blick auf CK19 als epithelialen Marker gelenkt, der in soliden Tumoren der Brust stark exprimiert und auch im peripheren Blut als Tumormarker eingesetzt wird.

Ziel der Arbeit sollte sein, zu überprüfen, ob BMP2, BMPR-II, Smad4 und CK19 in disseminierten Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen auf RNA- und Proteinebene exprimiert werden und ob sich ein Unterschied zu Blutzellen von gesunden Probandinnen ergibt. Weiterhin sollte untersucht werden, in wieweit der TNM- Status, das Stadium, das Grading oder der Rezeptorstatus der Patientinnen in Zusammenhang mit der Expression von BMP2, BMPR-II, Smad4 und CK19 in disseminierten Tumorzellen gebracht werden können.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Peripheres Blut

Es wurden 6-9ml EDTA- Blut von 42 Patientinnen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe und des Tumorzentrums der Friedrich Schiller Universität Jena verwendet. Die Patientinnen gaben ihr Einverständnis für die Verwendung ihres Blutes für Forschungszwecke, indem sie ein dafür vorgesehenes Formular unterschrieben.

Die Patientinnen wurden nach ihrer Erkrankung ausgesucht: es sollten nur Patientinnen, die an Mammakarzinomen litten, in die Studie aufgenommen werden. Die klinischen Daten der Patientinnen wurden aus den Akten der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe sowie des Tumorzentrums der Friedrich Schiller Universität Jena entnommen (siehe Tabelle 1).

Sowohl für die RNA- als auch für die Proteinanalyse standen somit Proben von je 21 Patientinnen zur Verfügung. Leider ließ es sich aufgrund der geringen Blutmenge von 8ml pro Patientin nicht realisieren, RNA und Proteine aus einer Blutprobe zu gewinnen, da ansonsten die RNA- und Proteinmenge für die Analyse zu gering gewesen wäre.

Außerdem erklärten sich fünf gesunde Probandinnen bereit, ihr Blut für diese Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Hier konnten jeweils 16ml Blut entnommen werden, 8ml für die RNA- und 8ml für die Protein- Analyse.

Kriterium	Zahl der Patientinnen	Kriterium	Zahl der Patientinnen
Invasiv-duktales Karzinom, DCIS	27	Mammaablationes	14
Invasiv-lobuläres Karzinom, LCIS	4	Brusterhaltende Therapie	26
Andere Mamma- Karzinome	11	Chemotherapien	29
T- Status unbekannt	2	Tamoxifentherapie	11
T- Status Tis	5	ER- Status pos	30
T- Status T1	23	ER- Status neg	6
T- Status T2	11	ER- Status unbekannt	14
T- Status T3	5	PR- Status pos	24
T- Status T4	4	PR- Status neg	11
N- Status unbekannt	2	PR- Status unbekannt	15
N- Status N0	31	Her2- Status pos	18
N- Status N1	14	Her2- Status neg	7
N- Status N2	1	Her2- Status unbekannt	25
N- Status N3	2	Stadium 0	5
M-Status unbekannt	2	Stadium 1	15
M-Status M0	45	Stadium 2a	3
M-Status M1	3	Stadium 2b	6
Grading unbekannt	8	Stadium 3a	6
Grading G0	1	Stadium 3b	2
Grading G1	3	Stadium 4	4
Grading G2	10	Stadium unbekannt	4
Grading G3	26		
Grading G4	2		

Tabelle 1: Klinische Daten der Patientinnen

3.2. Gewinnung der weißen Blutkörperchen und der Tumorzellen aus dem EDTA- Blut

Um aus dem EDTA- Blut die Tumorzellen und die weißen Blutkörperchen zu gewinnen, wurde zunächst eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurden die 6-9ml EDTA- Blut mit 40ml Erythrozytenlysepuffer (Qiagen, Hilden) gemischt. Dieses Gemisch wurde für 10min stehen gelassen und danach zentrifugiert (10min bei 1200 U/min und 21°C). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellsediment wiederum in 15ml Erythrozytenlysepuffer gelöst. Dann wurde das Gemisch nochmals für 10min stehen

gelassen und 10min zentrifugiert. Nachdem der Überstand wieder abgegossen wurde, wurde das Zellsediment in 500µl Phosphat- EDTA- Puffer (Invitrogen) gelöst. In diesem Puffer lagen nun also die Tumorzellen und die weißen Blutzellen gemischt vor und konnten der Zellseparation zugeführt werden.

3.3. Zellseparation mit MACS

Die Zellseparation wurde mit dem SuperMACS (MiltenyiBiotec) durchgeführt. Das Prinzip der Separation ist, dass die Tumorzellen Magnetpartikel aufnehmen, somit magnetisch werden und dann über eine magnetische Säule gegeben werden. Im Gegensatz dazu nehmen weiße Blutkörperchen wenige Magnetitteilchen auf und bleiben nicht in der Magnetsäule zurück. Die magnetischen Tumorzellen werden in der Säule zurückgehalten und können im zweiten Schritt eluiert werden (siehe Abbildung 4).

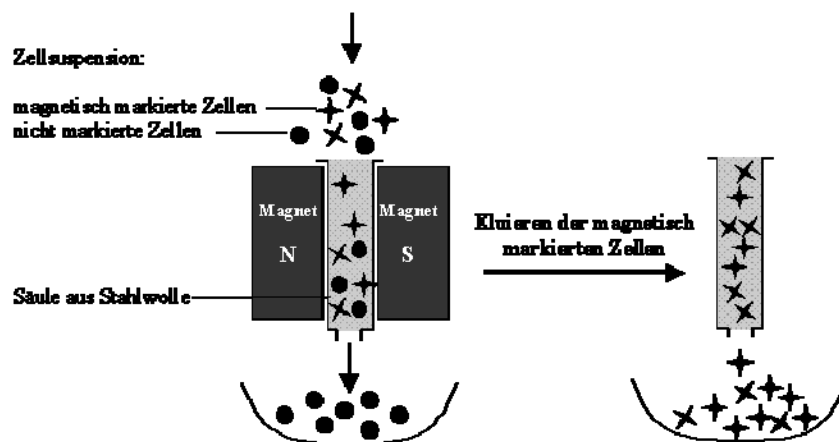


Abbildung 4: Prinzip der Zellseparation mit dem MACS- System (Schwalbe 2004)

Die Probe einer Patientin enthielt wie in 3.2. beschrieben ein in 500µl Phosphat- EDTA- Puffer gelöstes Gemisch von Tumorzellen und weißen Blutzellen. Diese Zellen wurden zunächst für 8min bei Zimmertemperatur mit 5µl Magnetitteilchenlösung (hergestellt von Dr. Manuela Schwalbe) inkubiert. Die Magnetitteilchen, die hier benutzt wurden, bestanden aus einem magnetischen Kern mit einer Hülle aus glykosylierten Dextranen (siehe Abbildung 5).

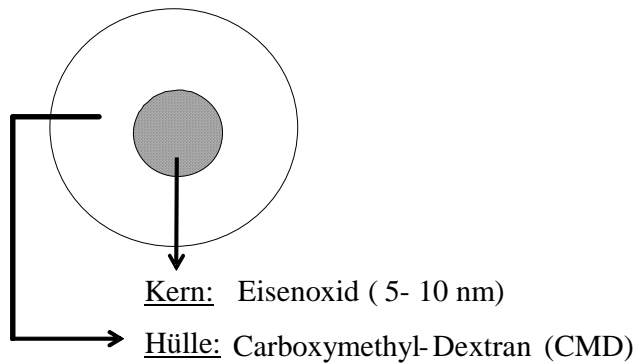


Abbildung 5: Aufbau eines Magnetitteilchens

Während der 8min Inkubationszeit wurde je nach Zellzahl eine MS (für 10^7 magnetische Zellen und 2×10^8 Gesamt- Zellen) oder eine LS (für 10^8 magnetische Zellen und 2×10^9 Gesamtzellen) Separationssäule (MiltenyiBiotec), bestehend aus magnetisierbarem Material, in einen U-förmigen Magneten platziert und mit 500 μ l (MS) bzw. 1000 μ l (LS) Phosphat- EDTA- Puffer equilibriert. Dann wurde die Probe über die Säule gegeben und anschließend mit 500 μ l bzw. 1000 μ l Phosphat- EDTA- Puffer nachgespült. Alle Zellen, die Magnetitteilchen aufgenommen hatten, blieben jetzt in der magnetischen Säule zurück und die nichtmagnetischen Zellen liefen durch. Diese Negativfraktion wurde in einem Reagenzglas aufgefangen.

Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen und die Positivfraktion mit 1000 μ l (MS) bzw. 2000 μ l (LS) Phosphat- EDTA- Puffer eluiert. Dabei wurde der Puffer mit einem Stempel durch die Säule gedrückt. Die Positivfraktion wurde in einem zweiten Reagenzglas aufgefangen.

Sowohl die Negativfraktion als auch die Positivfraktion (je 1 bzw. 2ml) wurde in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und für 15sec bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Zellpellet mit den nun angereicherten Tumorzellen in der Positivfraktion und den weißen Blutzellen in der Negativfraktion wurde weiterverarbeitet.

3.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte am Coulter Counter Z2 (Beckmann Coulter). Dazu wurden 50 μ l der Positiv- bzw. Negativfraktion direkt nach der Separation ohne vorherige Zentrifugation in 20ml isotonische Lösung (Coulter Isoton II Diluent) gegeben und in der Messkammer des Beckman Coulters gezählt.

3.5. Zelluntersuchung mit dem LSC

Für die Untersuchung der Positiv- und Negativfraktionen von fünf Patientinnen am LSC wurden die Fraktionen direkt nach der Separation, also ohne Zentrifugation, noch im Phosphat- EDTA- Puffer befindlich, mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Dazu wurde zu den je 1000µl Probe zuerst 30µl FCR- Blocking- Puffer gegeben, um unspezifische Fc- Rezeptoren auf den Zellen zu blockieren. Danach kamen je 12,5µl Anti-HEA-FITC und 2,5µl CD45- PE (MiltenyiBiotec) hinzu. CD45- PE ist ein Antikörper gegen Oberflächenantigene von Leukozyten. Er ist Phycoerythrin- konjugiert und fluoresziert orangefarben. Anti-HEA-FITC bindet an Antigene von epithelialen Zellen, in diesem Falle Tumorzellen, und fluoresziert grün. Dieses Gemisch wurde geschwenkt und für 15min zum Inkubieren in den Kühlschrank gestellt.

Danach wurden 160µl Phosphat- EDTA- Puffer und 20µl der gefärbten Probe auf einen Objektträger gegeben, der unter das LSC gelegt wurde. Das LSC maß dann die Zellen aus und nachdem diese Messung beendet war, konnten die einzelnen detektierten Zellen nochmals angesehen werden, um den prozentualen Anteil an Tumorzellen im Tumorzell- Leukozyten- Gemisch zu bestimmen. Die Tumorzellen konnten dabei an ihrem grün fluoreszierenden Cap identifiziert werden (siehe Abbildung 6).

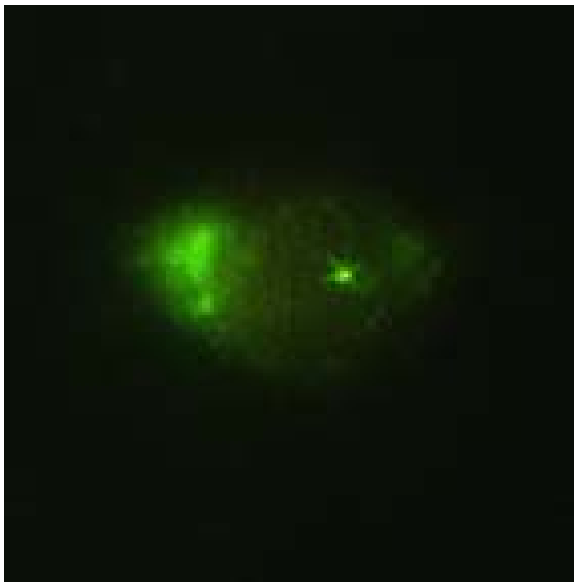


Abbildung 6: Tumorzelle im LSC, deutlich erkennbar am grün fluoreszierenden Cap

3.6. RNA- Untersuchungen

3.6.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Mithilfe dieses Kits können bis zu 100µl RNA aus bis zu 10^7 Zellen gewonnen werden. Zunächst wurden die Zellpellets der Positiv- und Negativfraktionen in 500µl Lysepuffer (495 µl RLT-Puffer mit 5µl 98%igem 2-Mercaptoethanol) gelöst. Dieses Lysat wurde in den Qia-Shredder gegeben und dann für 2min bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Qia-Shredder wirkt wie ein Sieb, das die Zelltrümmer zurückhält. Das Zentrifugat wurde mit 500µl 70%igem Ethanol vermischt und in die Rneasy mini SpinColumn pipettiert. Diese enthält eine Silicagel- Membran, die RNA bindet. Nun wurde wieder zentrifugiert: 15sec bei 10000 U/min. Nachdem das Zentrifugat verworfen wurde, wurden 500µl RW1-Waschpuffer in die SpinColumn gegeben und für 10 min stehengelassen. Danach wurde nochmals für 15sec bei 10000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wiederum verworfen; in die SpinColumn wurden zweimal nacheinander 300µl RPE- Waschpuffer gegeben und beim ersten Mal 15sec, beim zweiten Mal 2min bei 10000 U/min zentrifugiert. Diese Waschschrte dienten der Aufreinigung der an die Silicagel-Membran gebundene RNA. Nun wurde die SpinColumn auf ein Eppendorfröhrchen gestellt und 50µl RNase- freies Wasser dazugegeben. Ein letztes Mal wurde zentrifugiert (60sec bei 14000 U/min), um die RNA zu eluieren. Die so gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.6.2. Bestimmung der RNA- Konzentration

Die Bestimmung der RNA- Konzentrationen in den Positiv und Negativproben war insofern wichtig, als dass bei der anschließenden c-DNA- Synthese immer 1µg RNA eingesetzt werden sollte und somit berechnet werden musste, wie viel µl der RNA-Lösung 1µg RNA entsprachen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop, einem Photometer, das bei 260nm Wellenlänge die RNA- Konzentrationen misst. Dazu wurde zunächst ein Leerwert bestimmt, für den 1µl Aqua dest. auf den Messpunkt des NanoDrop aufgebracht wurde. Danach konnte je 1µl der RNA-Proben ebenfalls auf diesen Messpunkt aufgebracht werden und die Konzentration bestimmt werden.

3.6.3. cDNA- Synthese

Ziel der cDNA- Synthese ist, die in den Proben vorhandene RNA durch reverse Transkription in cDNA umzuwandeln. Da aber nur die mRNA von Interesse war, wurden spezielle Oligo- dT- Primer verwendet, die an den Poly(H)- Schwanz von mRNA- Molekülen binden. So wurde nur die mRNA von der Reversen Transkriptase erkannt und zu cDNA umgeschrieben.

Als Reverse Transkriptase wurde M-MLV- (moloney murine leukemia virus) Reverse Transkriptase benutzt, die ihre größte Aktivität bei 37°C hat. Am Ende der Reaktion wurde sie durch Erhitzen auf 95°C inaktiviert.

Um die RNA vor Abbau zu schützen, wurde RNase OUT, ein Ribonuklease- Inhibitor hinzugegeben.

Zunächst wurde für die cDNA- Synthese der Synthese- Mix zusammenpipettiert:

Dieser enthielt für jede Probe:

4µl 5x First Strand Buffer

2µl DTT

1µl Random Primer (Roche)

1µl Oligo- Primer- DT (Roche)

2µl dNTP- Mix

0,5µl RNase OUT (Invitrogen)

1µl reverse Transkriptase

Da in den Proben nur sehr wenig RNA vorhanden war, musste jeweils die größtmögliche Menge an RNA-Lösung, nämlich 8,5µl eingesetzt werden. Somit konnte allerdings nicht die zur cDNA- Synthese vorgesehene einheitliche mRNA- Menge von 1µg gewährleistet werden. Die mRNA- Lösung wurde für 5min bei 65°C erhitzt und dann mit 11,5µl Synthesemix vermischt. Das Gemisch inkubierte 10min bei Raumtemperatur und wurde danach für 60min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben für 8min bei 95°C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Am Ende wurde die gewonnene cDNA kurz abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

3.6.4. Real- time- RT- PCR

Alle PCR- Arbeiten wurden am LightCycler 1.5 (Roche) mit dem LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I- Kit (Roche) durchgeführt.

Das Prinzip der Real- Time- RT- PCR unterscheidet sich nicht wesentlich von der konventionellen RT- PCR. Ziel ist die Amplifikation eines bestimmten Genabschnittes, der durch die eingesetzten Primer festgelegt wird. Die cDNA wird durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und zerfällt dabei in ihre Einzelstränge. Bei einer Primer- spezifischen Temperatur (siehe Tabelle 2) erfolgt dann das Annealing, bei dem sich die Primer spezifisch an die Einzelstränge anlegen. Dabei gibt es einen Sense- Primer, der an den einen Strang bindet und einen Antisense- Primer, der an den entsprechenden Gegenstrang bindet. In der darauf folgenden Elongationsphase bei 72°C verlängert die Taq- Polymerase die Primer in 5'-3'- Richtung, wodurch doppelsträngige DNA entsteht. Diese drei Schritte werden zyklisch wiederholt und so wird die cDNA exponentiell amplifiziert (siehe Abbildung 7).

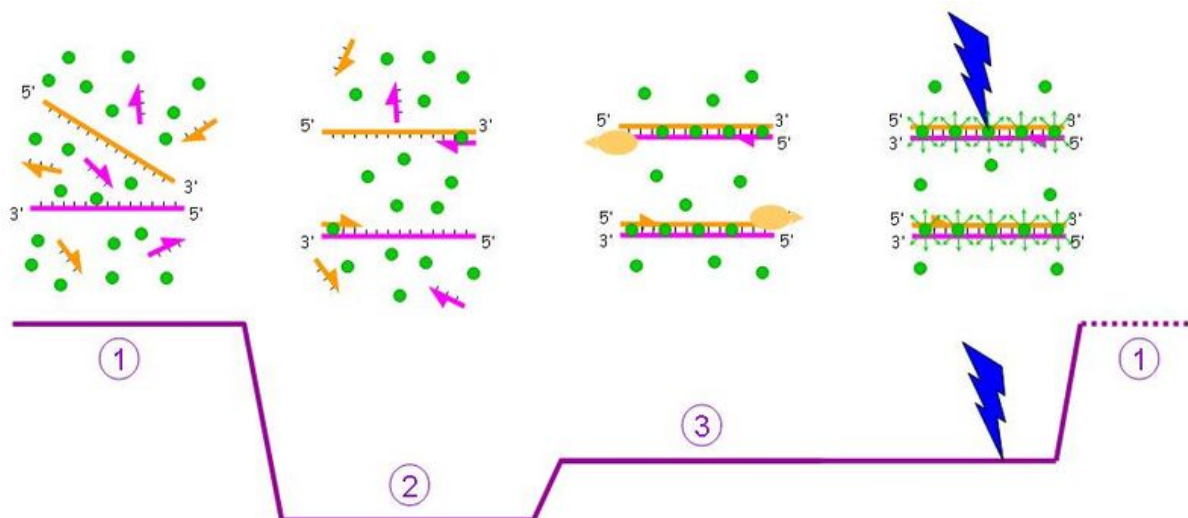


Abbildung 7: Schematische Darstellung der PCR mit SYBR Green I (1: Denaturierung, 2: Annealing, 3: Elongation)

Das LightCycler- System hat mehrere Vorteile gegenüber der konventionellen RT- PCR. Zum Erhitzen und Abkühlen wird Luft statt Wasser benutzt, wodurch die Zyklen sehr viel kürzer sind. Dadurch dauert eine PCR am LightCycler nur 30 bis 45 Minuten im Gegensatz zu zwei Stunden Dauer einer konventionellen RT- PCR. Außerdem ist die Real- Time- PCR am LightCycler sensitiver als die RT- PCR, es können kleinere Konzentrationen an cDNA gemessen werden.

Das Detektionsprinzip des LightCyclers beruht auf Fluoreszenz. Das hier eingesetzte SYBR Green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der während der Elongationsphase in die DNA eingelagert wird. Ungebunden sendet er nur ein sehr geringes Fluoreszenzsignal aus, ist er aber gebunden, fluoresziert er sehr stark. Am Ende einer jeden Elongationsphase misst der LightCycler das Fluoreszenzsignal. Dieses nimmt mit der Anzahl der Zyklen exponentiell zu (siehe Abbildung 8).

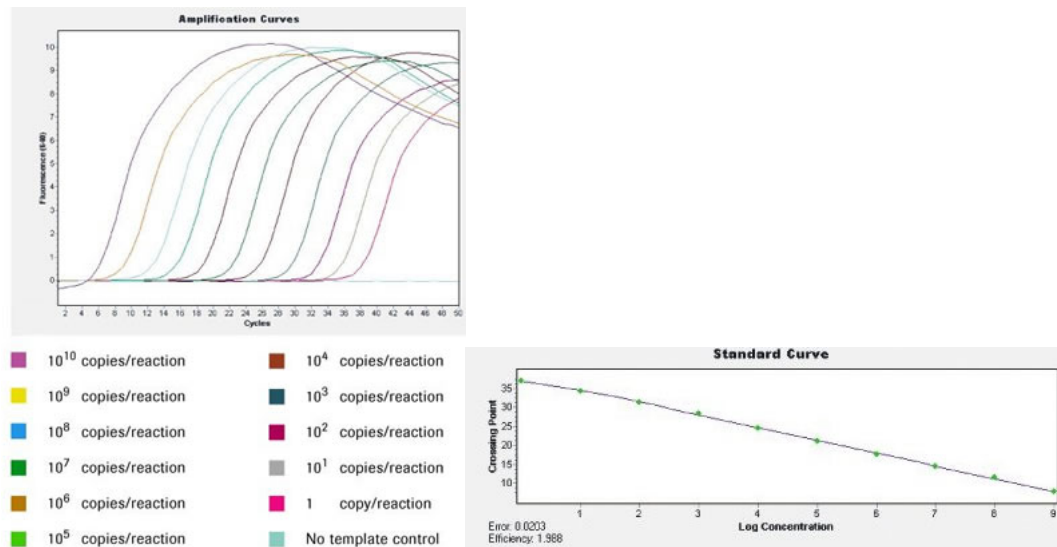


Abbildung 8: Amplifikations- und Standardkurve des LightCycler- Systems

Ein weiterer Vorteil der PCR am LightCycler ist, dass mit der speziellen Software direkt die cDNA- Konzentrationen berechnet werden können. Dazu vergleicht das Programm die unbekannten cDNA- Konzentrationen mit Standard- Lösungen, deren DNA- Konzentrationen bekannt sind. Es wird also eine Standardkurve erstellt, in die dann die unbekannten Proben eingeordnet werden (siehe Abbildung 8). Entscheidend hierbei ist, dass bei der Real- time- RT- PCR eine Konzentrationsmessung in der log- Phase erfolgt, während bei der konventionellen RT- PCR eine Endpunktbestimmung vorliegt.

Als Standard für Beta- Aktin, BMP2 und BMPR-II wurde ein Kontrollfragment genutzt, das die Sequenzen folgender cDNA trägt: BMP1-8, BMPR-IA, BMPR-II, Beta2- Mikroglobulin, GAPDH, Beta- Aktin (siehe Abbildung 9). Da für die cDNA von CK19 und Smad4 kein Standard vorhanden war, wurde für diese Untersuchungen β - Aktin als Standard genutzt. Die Produkte des Kontrollfragmentes nach der PCR unterscheiden sich etwas von denen der natürlichen cDNA (siehe Abbildung 9):

BMP-Kompetitor Fragment

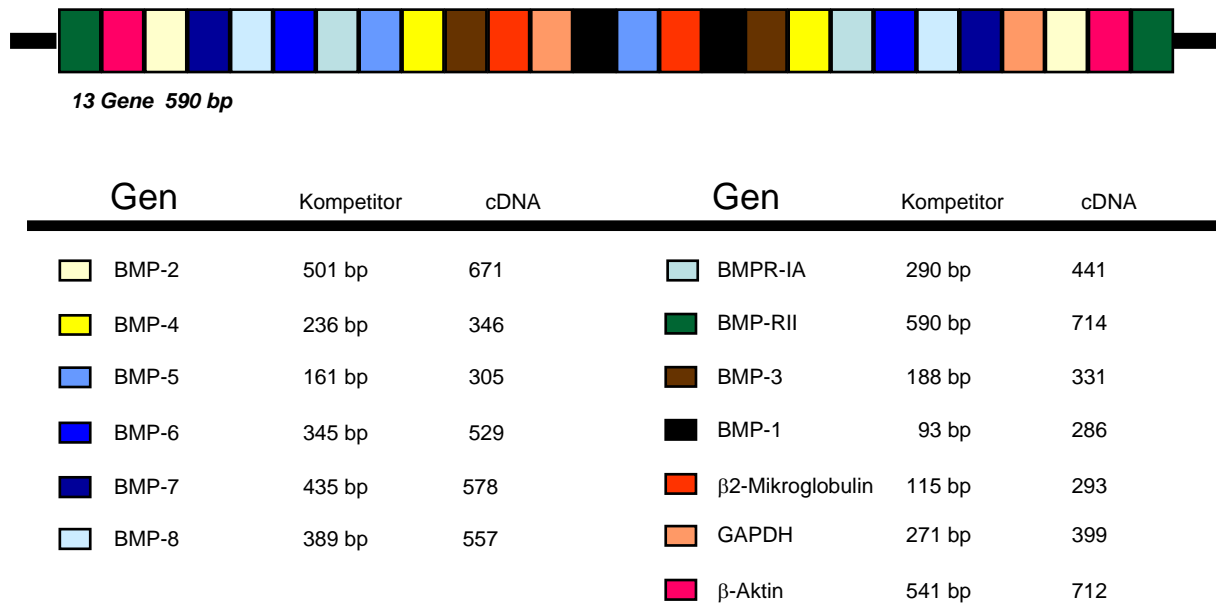


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Kontrollfragments, das als Standard genutzt wurde

Für die Durchführung der Real- time- PCR wurde zunächst der Master- Mix hergestellt. Dafür wurden 14µl Taq- Polymerase in den fertigen Reaktionsmix pipettiert und danach gevortext. Nun wurde der PCR- Mix vorbereitet. Für jede Probe wurden 14µl destilliertes Wasser, 1µl Primer für das nachzuweisende Gen (siehe Tabelle 2) und 4µl Master- Mix zusammenpipettiert.

Primer	Größe	Sequenz	Annealing- T.
β-Aktin	712bp	1. 5' CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT 3'	60,1 °C
		2. 5' GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC 3'	60,2 °C
CK19äußere	425bp	1. 5' TTT GAG ACG GAA CAG GCT CT 3'	55,0 °C
		2. 5' CAG CTC AAT CTC AAG ACC CTG 3'	53,6 °C
innere	425bp	1. 5' GCA GAT CGA AGG CCT GAA 3'	53,2 °C
		2. 5' TGA ACC AGG CTT CAG CAT C 3'	53,1 °C
BMP2	671bp	1. 5' TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA CAT CG 3'	63,9 °C
		2. 5' GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC 3'	51,9 °C
BMPR-II	714bp	1. 5' GGG AGA AAT CAA AAG GGG ACA TA 3'	57,0 °C
		2. 5' ACA GAA TGA GCA AGA CGG CAA GAG C 3'	63,6 °C
Smad4	243bp	1. 5' AGG TGA AGG TGA TGT TTG 3'	
		2. 5' GCT ATT CCA CCT ACT GAT 3'	

Tabelle 2: Benutzte Primer bei der Real- Time PCR.

Danach wurden die Reaktionsgefäße (Kapillaren) in einen Kühlblock gestellt und mit 1µl Probe (Wasser, Standards oder cDNA-Probe) und 19µl PCR- Mix befüllt. Anschließend wurden die Kapillaren mit den Proben kurz zentrifugiert und mit einem kleinen Stopfen verschlossen. Dann wurden die Kapillaren nach einem bestimmten Schema (siehe Tabelle 3) in den LightCycler gestellt und je nach zu bestimmender DNA ein spezielles Programm gestartet (siehe Tabelle 4).

Nummer	Probe	Nummer	Probe
1	Wasser	14	Patientin 3 pos.
2	Standard 1	15	Patientin 3 pos.
3	Standard 2	16	Patientin 3 neg.
4	Standard 3	17	Patientin 3 neg.
5	Standard 4	18	Patientin 4 pos.
6	Patientin 1 pos.	19	Patientin 4 pos.
7	Patientin 1 pos.	20	Patientin 4 neg.
8	Patientin 1 neg.	21	Patientin 4 neg.
9	Patientin 1 neg.	22	Patientin 5 pos.
10	Patientin 2 pos.	23	Patientin 5 pos.
11	Patientin 2 pos.	24	Patientin 5 neg.
12	Patientin 2 neg.	25	Patientin 5 neg.
13	Patientin 2 neg.	26	

Tabelle 3: Beladungsschema LighCycler

RNA	PCR Progr.	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklenzahl
Aktin	Aktin Fast Start	95°C	59°C	72°C	50
CK19	Aktin Fast Start	95°C	59°C	72°C	50
BMP2	Aktin Fast Start	95°C	59°C	72°C	50
BMPR-II	BMPR-II Fast Start	95°C	58°C	72°C	70
Smad 4	Aktin Fast Start	95°C	59°C	72°C	50

Tabelle 4: LightCycler Programme.

Nach ca. 40min war die Analyse beendet und die Software des Light- Cyclers hatte die Konzentrationen der zu bestimmenden Proben (jeweils Doppelbestimmungen) berechnet.

3.6.5. Agarose- Gelelektrophorese

Die Agarose- Gelelektrophorese dient der Auftrennung unterschiedlich langer DNA- Stücke. Die DNA wandert dabei aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode durch das Agarosenetz. Dadurch wandern kleinere DNA- Stücke weiter als größere DNA- Stücke. Anhand eines mitgeführten Markers kann die Größe der aufgetragenen DNA bestimmt und somit der in der PCR amplifizierte Genabschnitt identifiziert werden. Die Agarose- Gelelektrophorese dient also der Kontrolle der vorherigen Real- time- RT- PCR am LightCycler.

Um die DNA sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid in das Agarosegel gemischt. Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}N_3Br$) ist ein roter organischer Farbstoff, der an Nukleinsäuren bindet. Durch diese Bindung nimmt die Intensität der Fluoreszenz des Farbstoffs unter ultraviolettem Licht (254nm Wellenlänge) stark zu.

Für die Durchführung erfolgte zunächst die Herstellung eines 1%iges Agarose- Gels, das für die Auftrennung von DNA in der Größe von 500 bis 1000 Basenpaaren geeignet ist. Dazu wurden 5g Agarose in 500ml TAE- Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Dann wurde die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt und 10µl Ethidiumbromid (2µl pro 100 ml) zugegeben. Die Lösung wurde danach umgehend in die Gelform gegossen und ein Kamm mit 22 Zähnen wurde hineingesteckt, um die späteren Taschen zu formen. Nach zwei Stunden war das Gel ausgehärtet und konnte für die Elektrophorese genutzt werden. Dazu wurden je 15µl der DNA- Proben mit je 3µl Ladepuffer (Bromphenolblau und Glycerin) vermischt und nach folgendem Schema in die Taschen des Agarosegels gegeben (siehe Tabelle 5):

Nummer	Probe	Nummer	Probe
1	Standardmarker	8	Patientin 3, Negativfraktion
2	Negativkontrolle (Wasser)	9	Patientin 4, Positivfraktion
3	Patientin 1, Positivfraktion	10	Patientin 4, Negativfraktion
4	Patientin 1, Negativfraktion	11	Patientin 5, Positivfraktion
5	Patientin 2, Positivfraktion	12	Patientin 5, Negativfraktion
6	Patientin 2, Negativfraktion	13	Negativkontrolle (Wasser)
7	Patientin 3, Positivfraktion	14	Standardmarker

Tabelle 5: Beladungsschema Agarosegellauf

Als Laufpuffer wurde TAE- Puffer (20ml TAE mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt) verwendet. Die Gelelektrophorese lief bei einem Maximum von 200V und 0,2A für eine Stunde. Danach wurden die DNA- Banden unter UV- Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.7. Protein- Untersuchungen

3.7.1. Protein- Isolierung

Als erstes musste für die Proteinisolierung ein Proteinlysepuffer angesetzt werden. Dieser enthielt in 8ml:

HEPES (pH 7,5)	800µl
NaCl	1200µl
Aqua dest.	2304µl
EDTA	800µl
EGTA	160µl
Triton-X-100	800µl
Na- Pyrophosphat	800µl
Na- Fluorid	800ml
Na- o- Vanadat	160µl
Pepstatin	8µl
Aprotinin	8µl
Leupeptin	8µl
Pefablock	80µl

Das Zellpellet wurde in 500 µl Lysepuffer gelöst und für 20min auf Eis stengelassen. Ca. alle 5min wurde das Gemisch homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 15min bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde in ein neues Eppendorfröhrchen pipettiert und bei -20°C gelagert.

3.7.2. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- Page)

Durch die SDS- Page können Proteine nach ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt werden. Das Prinzip ist ähnlich dem der Agarose- Gelelektrophorese: Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und

bleiben je nach ihrer Größe früher oder später im Gel hängen. Anhand eines mitgeführten Längenstandards und ihres Laufverhaltens können die Proteine dann identifiziert und quantifiziert werden werden.

Zunächst wurde die Proteinkonzentration der Proben gemessen. Dazu wurden 498µl destilliertes Wasser mit 2µl Probe (für den Leerwert 2µl Wasser) in einer Plastik- Einmal-Küvette vermischt. Dann wurden 500µl Bradford- Reagenz dazugegeben und das Gemisch für 5min im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurde das Photometer auf die Wellenlänge 595nm eingestellt. Anschließend wurden der Leerwert und die Probenwerte jeweils in Doppelbestimmung gemessen und mit dem Mittelwert (OD) daraus die Proteinkonzentration berechnet (siehe Formel 1).

$$C \text{ Probe } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = 10 * (0,8548 * OD^2 + 0,4474 * OD)$$

Formel 1: Berechnung der Proteinkonzentration (C bedeutet Konzentration, OD Mittelwert)

Für die SDS- Page sollte pro Probe 50µg Protein eingesetzt werden. Das dafür benötigte Proben- und Lysepuffervolumen konnte mit folgenden Formeln berechnet werden (Formel 2 und Formel 3):

$$V \text{ Probe } (\mu\text{l}) = 70\mu\text{g} / C \text{ Probe } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Formel 2: Berechnung des Probenvolumens für die SDS- Page (V bedeutet Volumen, C Konzentration)

$$V \text{ Lysepuffer } (\mu\text{l}) = 30\mu\text{l} - V \text{ Probe } (\mu\text{l})$$

Formel 3: Berechnung des Lysepuffervolumens für die SDS- Page (V bedeutet Volumen)

Leider stellte sich heraus, dass in einigen Proben eine so geringe Proteinmenge vorhanden war, dass es sich nicht realisieren ließ, bei allen Proben einheitliche 50µg in 30µl maximalen Geltaschenvolumens zu erreichen. In diesen Fällen wurde mit der Maximalmenge von 30µl gearbeitet, um die größtmögliche Proteinmenge für den Nachweis zu erreichen.

Nun wurden für jede Probe folgende Lösungen zusammenpipettiert:

10µl 4xXT-SB

x µl Lysepuffer

x µl Proteinprobe

2µl Reducing Agent

Dieses Gemisch wurde für 5min bei 95°C erhitzt und gevortext. Währenddessen wurde die Gelkammer pro Gel mit 500ml Laufpuffer, bestehend aus 475ml destilliertem Wasser und 25ml 20x XT- MES, gefüllt und die Fertiggele der Firma BioRad in die Gelkammer eingesetzt. Danach wurden die Gele nach folgendem Schema beladen (siehe Tabelle 6).

Nummer	Probe	Nummer	Probe
1	Kaleidoskop- Marker (Biorad)	10	Patientin 4, Positivfraktion
2	Cruz- Marker (Santa- Cruz)	11	Patientin 4, Negativfraktion
3	Negativprobe (Lysepuffer)	12	Patientin 5, Positivfraktion
4	Patientin 1, Positivfraktion	13	Patientin 5, Negativfraktion
5	Patientin 1, Negativfraktion	14	Patientin 6, Positivfraktion
6	Patientin 2, Positivfraktion	15	Patientin 6, Negativfraktion
7	Patientin 2, Negativfraktion	16	Kaleidoskop- Marker (Biotech)
8	Patientin 3, Positivfraktion	17	Cruz- Marker (Biotech)
9	Patientin 3, Negativfraktion	18	Negativprobe (Lysepuffer)

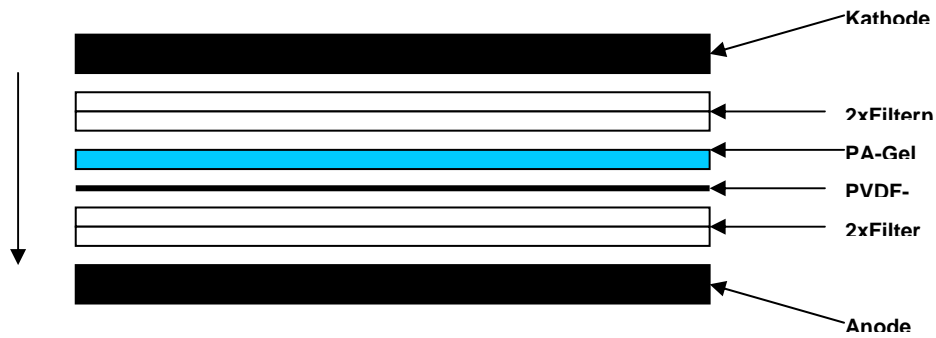
Tabelle 6: Beladungsschema SDS- Page.

Die Gelkammer wurde geschlossen und die Elektrophorese gestartet: 45min bei konstanter Spannung von 200V und einer Strombegrenzung von 200mA/Gel.

3.7.3. Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die Proteine aus dem Gel heraus auf eine PVDF-Membran zu übertragen, damit sie später über mehrere Antikörper und Fluoreszenz sichtbar gemacht werden können.

Das Gel wurde nach der SDS- Page aus der Kammer genommen und mit destilliertem Wasser abgespült. Danach wurde es für 20 min in Transferpuffer (siehe Anhang) inkubiert. Währenddessen wurde eine PVDF- Membran der Firma Biorad auf Gelgröße zugeschnitten und für 1 min in Methanol getaucht. Dann wurden die Membran und Filterpapiere (Biorad, extra thick blot paper, criterion size) für 5 min in Transferpuffer gelegt. Nun wurden diese mit Transferpuffer getränkten Komponenten in das Western-Blot- Gerät der Firma Biorad geschichtet, wie in Abbildung 10 gezeigt.

**Abbildung 10:** Western Blot Sandwich

Der Blot lief dann für 90 min mit einer Stromstärke von 90mA und einer Spannungsbegrenzung von 25V. Nachdem der Blot fertig war, wurde die PVDF-Membran mit destilliertem Wasser abgespült und mit 25 ml Blocking- Puffer (siehe Anhang) über Nacht abgeblockt, um die Protein- freien Stellen auf der Membran zu blockieren und unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden. Am zweiten Tag wurde die Membran dreimal (0, 5 und 10 min lang) mit TBS-T- Waschpuffer (siehe Anhang) gewaschen und dann über Nacht bei 4°C mit primärem Antikörper (siehe Tabelle 7) inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an die sich auf der Membran befindenden Proteine mit den entsprechenden antigenen Determinanten. Am dritten Tag wurde die Membran wiederum dreimal gewaschen und danach für 60 min bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper (siehe Tabelle 7) inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet wiederum nur an den primären Antikörper und damit indirekt an die Proteine.

Protein	Primärer Antikörper			Sekundärer Antikörper		
	Firma	Herkunft	Verdünnung	Firma	Herkunft	Verdünnung
Aktin	Santa Cruz	goat	1:500	Santa Cruz	donkey- anti- goat	1:2000
CK19	Calbiochem	mouse	1:100	Santa Cruz	goat- anti- mouse	1:2000
BMP2	Santa Cruz	goat	1:500	Santa Cruz	donkey- anti- goat	1:2000
BMPR-II	R+D	mouse	1:250	Santa Cruz	goat- anti- mouse	1:2000
Smad4	Santa Cruz	mouse	1:250	Santa Cruz	goat- anti- mouse	1:2000

Tabelle 7: Primäre und sekundäre Antikörper zur Proteindetektion

Darauf folgten nochmals drei Waschschritte, nach denen die Membran dann für die Auswertung am Lumineszent Image Analyzer (LAS), einer Kamera, die Chemolumineszenzintensitäten misst, vorbereitet wurde. Dafür wurde zunächst ECL-Reagenz, ein Lumineszenzfarbstoff, der an den sekundären Antikörper und damit indirekt an die Proteinbanden bindet, vorbereitet (für eine Membran wurden je 2,5ml von

Reagenz 1 und 2 vermischt und dunkel gelagert). Dann wurde der Waschpuffer von der Membran abgetropft und das ECL- Reagenz auf die Membran gegeben. Nachdem das ECL für 1 min im Dunkeln mit der Membran reagiert hatte, wurde diese zwischen zwei Folien platziert und am LAS ausgewertet. Abbildung 11 veranschaulicht nochmals die einzelnen Reaktionsschritte, die am Ende zur Lumineszenz führen.

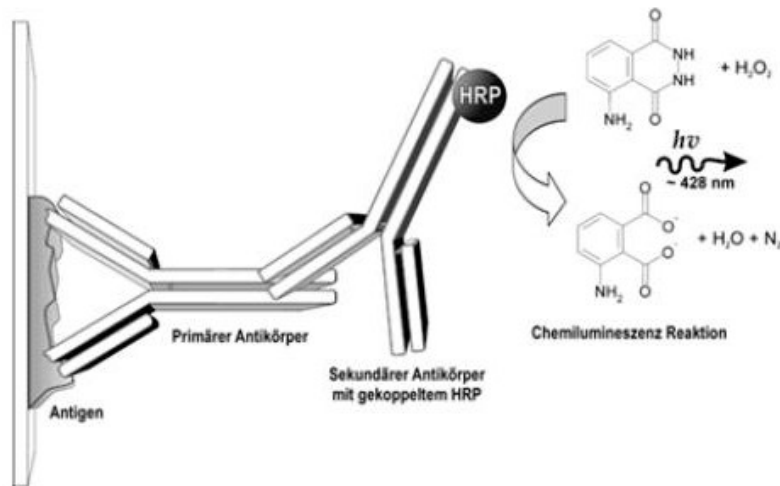


Abbildung 11: Prinzip der Darstellung von Proteinbanden

3.7.4. Auswertung am LAS und mit AIDA

Die Membran wurde in den Luminescent Image Analyzer LAS-1000 gelegt und die Chemolumineszenz für 10 min gemessen.

Die Bilder der Proteinbanden wurden anschließend mit dem Programm AIDA ausgewertet.

3.8. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde das Statistikprogramm SPSS in der Version 13.0.1 benutzt. Es sollten die Häufigkeitsverteilungen und Abhängigkeiten von verschiedenen nominal verteilten Variablen verglichen werden; dazu eignet sich am besten der Chi- Quadrat- Test. Er dient dem Vergleich der tatsächlich beobachteten Verteilung mit der erwarteten Verteilung. Dabei sollten die erwarteten Häufigkeiten nie weniger als 5 betragen, sonst ist der Test nicht gültig. Mithilfe der Tests wurde der p-Wert bestimmt. Statistische Signifikanz wurde dann erreicht, wenn p kleiner als 0.05 war. Als beachtenswert wurden aber auch Werte angesehen, die kleiner als 0.1 waren. Folgende Daten wurden miteinander verglichen: TNM- Status, UICC- Stadium, Grading, Rezeptorstatus, Erkrankung am Mammakarzinom und Probenfraktion mit der

Aktinkonzentration und der auf Aktin bezogenen relativen Konzentrationen von BMP2, Smad4 und CK19, außerdem das Stadium und die Erkrankung mit dem Rezeptorstatus sowie die Erkrankung mit dem Alter der Patientinnen. Dabei wurden die Werte von Mamma- Karzinom- Patientinnen mit denen von gesunden Probandinnen verglichen. Für die statistische Auswertung mittels des Chi- Quadrat- Tests mussten die Daten immer in zwei Gruppen eingeteilt werden. Dies erfolgte folgendermaßen (siehe Tabelle 8):

	Wert 0 zugewiesen, wenn	Wert 1 zugewiesen, wenn
Fraktion	negativ	positiv
Alter	<= 26 Jahre	> 26 Jahre
Erkrankung	gesund	Mammakarzinom
T- Status	T0, T1	T2, T3, T4
N- Status	N0	N1, N2, N3
M- Status	M0	M1
Stadium	Stadium 0 und 1	Stadium 2, 3 und 4
Grading	G0, G1, G2	G3
ER- Status	< 50%	>= 50%
PR- Status	< 50 %	>= 50%
Her2/neu- Status	negativ	positiv
Absolute Aktin- Konzentration RNA	$\leq 1,25 \times 10^{-4}$	$> 1,25 \times 10^{-4}$
Relative BMP2- Konzentration RNA	$\leq 4,03 \times 10^{-1}$	$> 4,03 \times 10^{-1}$
Relative Smad4- Konzentration RNA	$\leq 8,93 \times 10^{-1}$	$> 8,93 \times 10^{-1}$
Relative CK19- Konzentration RNA	$\leq 2,72 \times 10^{-1}$	$> 2,72 \times 10^{-1}$
Absolute Aktin- Konzentration Protein	$\leq 1,1$	$> 1,1$
Relative BMP2- Konzentration Protein	$\leq 0,07$	$> 0,07$
Relative Smad4- Konzentration Protein	$\leq 0,27$	$> 0,27$
Relative CK19- Konzentration Protein	$\leq 0,42$	$> 0,42$

Tabelle 8: Einteilung der Werte in Gruppen mit den Werten 0 und 1 zur statistischen Auswertung

Die Einteilung der Werte für die absoluten und relativen Konzentrationen der mRNA der fünf Gene und der Proteine erfolgte durch die Ermittlung des Medians für diese Werte. Alle Konzentrationen, die kleiner als der Median waren, erhielten den Wert 0, alle, die größer waren, erhielten den Wert 1.

4. Ergebnisse

Mithilfe der durchgeführten Experimente sollte die Expression von Aktin, CK19, BMP2, BMPR-II und Smad4 in disseminierten Zellen im Blut von Mammakarzinom-Patientinnen auf RNA- und Proteinebene untersucht und mit Proben von gesunden Probandinnen verglichen werden. Dazu wurden die in den Blutproben vorhandenen Zellen zunächst separiert und danach der mRNA- und Proteingehalt der relevanten Gene und Proteine bestimmt und verglichen. Weiterhin wurde anhand klinischer Daten der Zusammenhang der Expression dieser RNA und Proteine mit dem Hormonrezeptorstatus der Mammakarzinome untersucht.

4.1. Ergebnisse der Zellseparation

Um die Tumorzellen von den weißen Blutzellen zu separieren, wurden die Blutproben der Patientinnen nach der Erythrozytenlyse mit magnetischen Partikeln versetzt, die idealer Weise nur von den Tumorzellen aufgenommen werden sollten. Bei der darauf folgenden Separation wurden die Tumorzellen im Magnetfeld der Separationssäule zurückgehalten, während die weißen Blutzellen durch die Säule liefen und die Negativfraktion bildeten. Dann wurden die magnetischen Tumorzellen aus dem Magnetfeld herausgenommen und als Positivfraktion eluiert.

Im Anschluss daran wurden die Zellzahlen der Fraktionen mit Hilfe des Coulter Counters gezählt. Dabei zeigte sich, dass sich - bis auf vier Ausnahmen - immer mehr Zellen in der Negativfraktion als in der Positivfraktion befanden (siehe Diagramm 1).

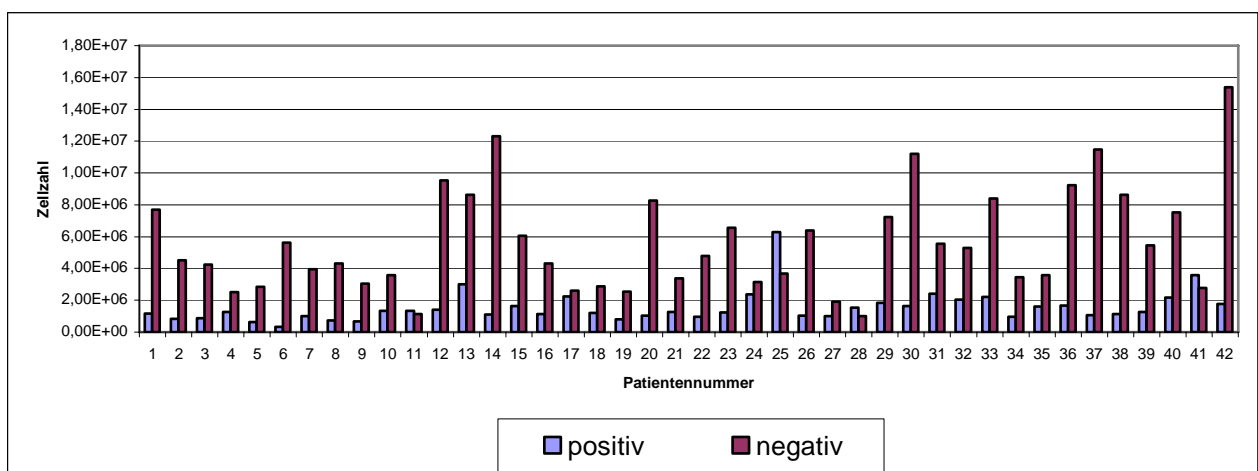


Diagramm 1: Zellzahlen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) der Patientinnenproben

Außerdem wurden Positiv- und Negativfraktionen von fünf weiteren Patientinnen mit Antikörpern gefärbt: grün fluoreszierender Anti- HEA- FITC für die Markierung der Tumorzellen und orange fluoreszierender CD45- PE für die Markierung der Leukozyten. Die gefärbten Proben dieser fünf Patientinnen wurden dann unter dem LSC ausgewertet, um den Anteil der Tumorzellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen. In der Positivfraktion befanden sich im Mittel $1,40 \times 10^6$ Tumorzellen von $7,23 \times 10^6$ sich in dieser Fraktion insgesamt befindlichen Zellen, in der Negativfraktion im Mittel nur $5,42 \times 10^5$ Tumorzellen von $8,43 \times 10^6$ Zellen in dieser Fraktion insgesamt. Somit war in der Positivfraktion ein höherer Anteil an Tumorzellen, nämlich durchschnittlich 23,2%, zu finden als in der Negativfraktion mit durchschnittlich 6,8% (siehe Diagramm 2). Somit befanden sich in der Positivfraktion 3,6 Mal mehr Tumorzellen als in der Negativfraktion.

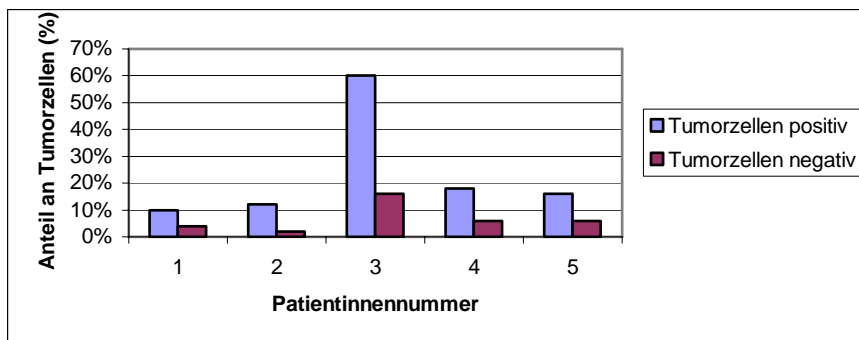


Diagramm 2: Anteil an Tumorzellen (%) in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) der Patientinnenproben

Die Proben der gesunden Probandinnen wurden genauso behandelt wie die Proben der Patientinnen. Auch hier befanden sich in der Negativfraktion mehr Zellen als in der Positivfraktion (siehe Diagramm 3).

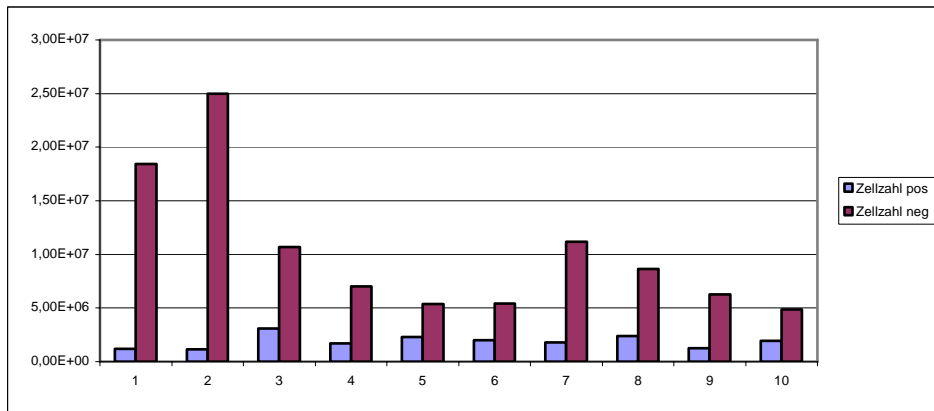


Diagramm 3: Zellzahlen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) der Probandinnenproben

Um die Zellzahlen von Probandinnen und Patientinnen besser vergleichen zu können, wurden jeweils die Mittelwerte von Positiv- und Negativfraktion gebildet und der Anteil an Zellen in der Positivfraktion im Bezug auf die Gesamtzellzahl errechnet. Dabei ergab sich, dass sich bei den Patientinnen 21% der Zellen in der Positivfraktion befanden, bei den gesunden Probandinnen nur 15% (siehe Tabelle 9).

	Mittelwerte der Patientinnen	Mittelwerte der Probandinnen	Anteil der Zellen in der Positivfraktion
Positivfraktion	1,54E6	1,87E6	21%
Negativfraktion	5,64E6	1,03E7	15%

Tabelle 9: Mittelwerte der Zellzahlen in Positiv- und Negativfraktion und Anteil der Zellen in der Positivfraktion

4.2. Vergleichswert Aktinkonzentration oder Zellzahl

Um bei den stark schwankenden Zellzahlen einen Standard zum besseren Vergleich der RNA- und Proteinkonzentrationen zu schaffen, sollte zunächst überprüft werden, ob Aktin von den einzelnen Zellen in konstanter Konzentration gebildet wurde. Dazu wurden jeweils der Quotient aus der Aktinkonzentration und der Zellzahl einer Probe gebildet (siehe Formel 4).

$$\text{Aktinkonzentration einer einzelnen Zelle} = \frac{\text{Aktinkonzentration einer Probe}}{\text{Zellzahl derselben Probe}}$$

Formel 4: Berechnung der Aktinkonzentration einer einzelnen Zelle

Der RNA- Gehalt an Aktin einer einzelnen Zelle lag dabei zwischen 1,01E-11 und 2,58E-10, der Proteingehalt zwischen 1,08E-8 und 1,49E-5. Diese Schwankungen ergeben sich aus den Problemen bei der cDNA- und Proteinsynthese, bei der jeweils keine einheitliche RNA- Menge von 1µl bzw. Proteinmenge von 50µg erzielt werden konnte (siehe Kapitel 3.6.3 und 3.7.2). Daher war ein Abgleich auf die Zellzahl in diesem Falle nicht zulässig, sodass die Aktinkonzentration als Vergleichswert gewählt wurde.

Zunächst sollen in den nachfolgenden Kapiteln des Ergebnisteils die absoluten RNA und Protein- Konzentrationen, so wie sie die Software des LightCyclers bzw. AIDA berechnet hat, ausgewertet werden. Hierbei wurde nicht beachtet, dass die zur cDNA- Synthese eingesetzten mRNA- Mengen sowie die bei der SDS- Page verwendeten Proteinmengen stark schwankten (siehe Kapitel 3.6.3 und 4.1). Um diese Schwankungen auszugleichen, wurden die absoluten Konzentrationen von BMP2, BMPR-II, CK19 und Smad4 auf die absolute Konzentration des Housekeeping- Gens Aktin abgeglichen. Dazu wurde der Quotient aus der cDNA- oder Protein- Konzentration der relevanten vier Gene und der Konzentration von Aktin gebildet (siehe Formel 5). Diese auf Aktin bezogenen Konzentrationen sollen im Weiteren relative Konzentrationen genannt werden und jeweils nach den absoluten Werten ausgewertet werden.

Relative cDNA- oder Protein- Konzentration = absolute cDNA- oder Protein-
Konzentration einer Probe des relevanten Gens / absolute cDNA- oder
Protein- Konzentration derselben Probe von Aktin

Formel 5: Berechnung der relativen cDNA- oder Protein- Konzentration

4.3. Ergebnisse der RNA- Analyse

Die Analyse der genspezifischen Expression erfolgte am LightCycler, nachdem die RNA isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgewandelt worden war. Der LightCycler misst die cDNA- Konzentrationen mit Hilfe von fluoreszierenden Stoffen, die während der PCR in die Doppelhelices eingebaut werden und vergleicht diese dann mit der Fluoreszenz von Standards, deren Konzentrationen bekannt sind.

Die Fluoreszenzkurven aller zu bestimmender cDNAs stiegen exponentiell an, die Kurve der Negativkontrolle Aqua dest. stieg in jedem LightCycler- Lauf als letztes und nur sehr flach an. Des Weiteren ergab sich in den Schmelzkurven aller fünf cDNAs je nur ein

Peak, was auf die Reinheit der PCR- Produkte hinweist. Um die Reinheit der PCR- Produkte nochmals zu testen, wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Bilder der Gele zeigen, dass für Aktin, BMP2, CK19 und Smad4 jeweils nur eine Bande zu sehen ist (siehe Abbildung 12). BMPR-II ließ sich auf dem Agarosegel leider nicht darstellen.

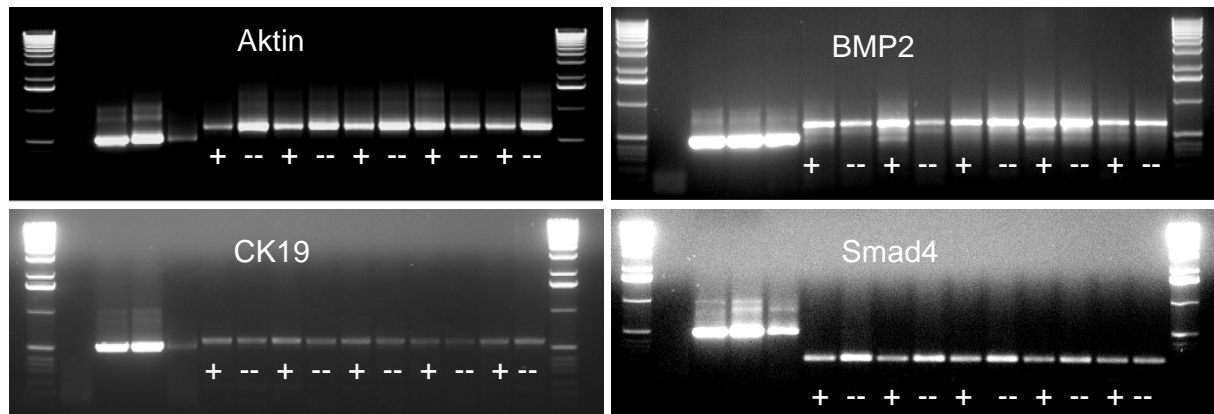


Abbildung 12: Agarosegelbilder der cDNA- Analyse von Aktin (712 bp), BMP2 (671 bp), CK19 (425 bp) und Smad4 (243 bp) (die Positiv- und Negativfraktionen sind mit + und – gekennzeichnet, die erste Bahn enthält die Negativkontrolle, die nächsten drei Bahnen die Standard- Marker)

4.3.1. Auswertung der absoluten RNA- Konzentrationen der Patientinnen

Zur Auswertung wurden die von der Light- Cyclers- Software berechneten cDNA- Konzentrationen herangezogen. Zunächst wurden die Werte der Positiv- und Negativfraktionen der Proben von 21 Patientinnen absolut miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Aktin- Konzentrationen in 19 von 21 Fällen in der Negativfraktion höher lagen als in der Positivfraktion der Tumorzellen. Die Smad4- Konzentration war sogar in 20 Fällen in der Negativfraktion höher als in der Positivfraktion und in nur einem Fall in der Tumorzellfraktion höher. Bei BMP2, BMPR-II und CK19 zeigte sich in 10 von 21 Fällen eine höhere Konzentration in der Tumorzellfraktion als in der Leukozytenfraktion. (siehe Tabelle 10 und Diagramm 4)

	Aktin	BMP2	BMPR-II	Smad4	CK19
Positiv > Negativ	2	10	10	1	10
Negativ > Positiv	19	11	11	20	11

Tabelle 10: Vergleich der **absoluten** cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben

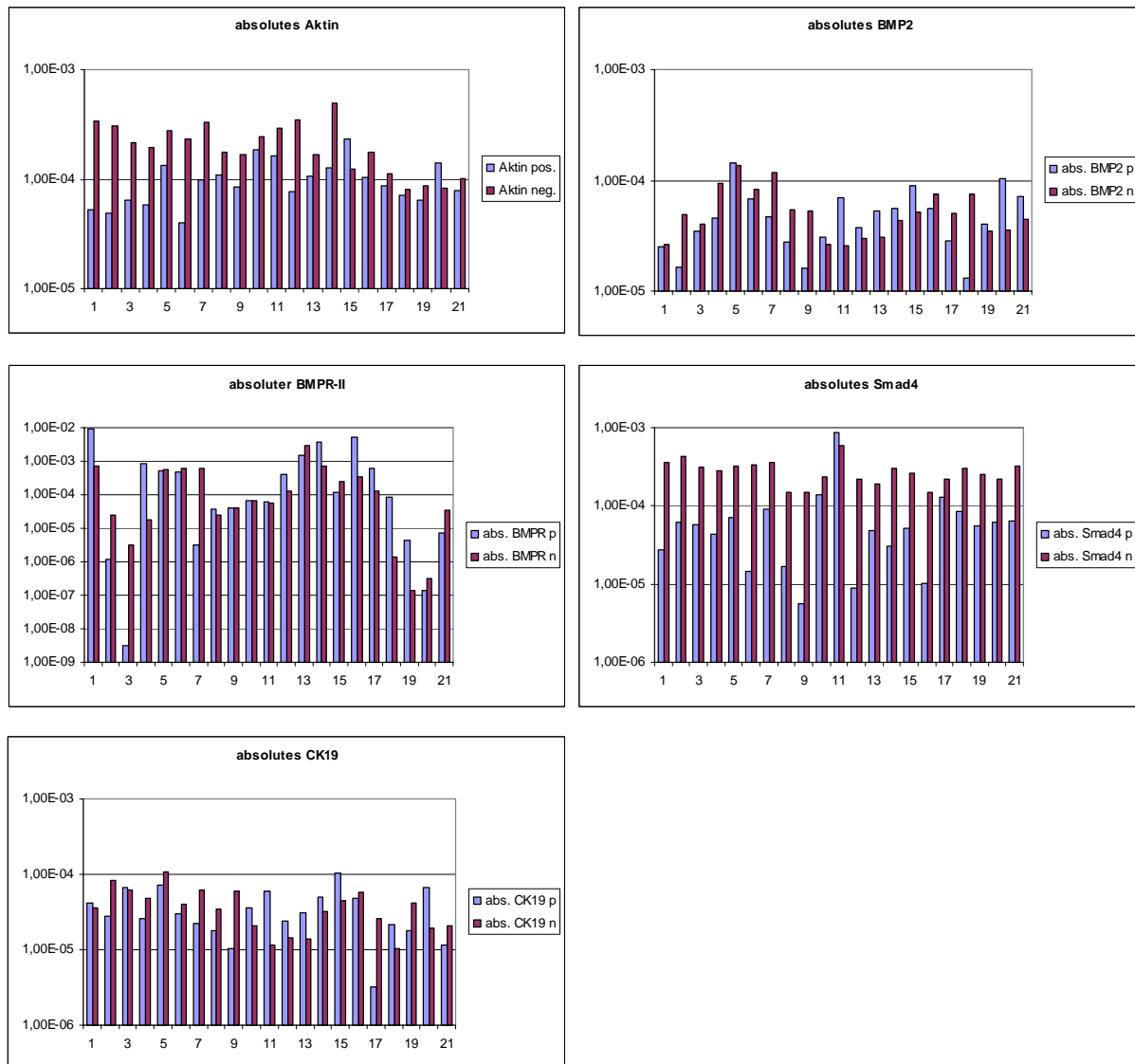


Diagramm 4: Vergleich der **absoluten** cDNA- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Patientinnen- Proben

4.3.2. Auswertung der relativen RNA- Konzentrationen der Patientinnen

Bezüglich der relativen RNA- Konzentrationen zeigte sich, dass BMP2 und CK19 in 16 von 21 Fällen eine höhere relative Konzentration in der positiven Tumorzellfraktion aufwiesen. Die relative Konzentration von BMPR-II war in 13 von 21 Fällen in der Positivfraktion höher als in der Negativfraktion, wobei hier sehr starke Schwankungen zu verzeichnen waren. Smad4 dagegen zeigte in 20 von 21 Fällen in der Negativfraktion der Lymphozyten eine höhere relative Konzentration als in der Positivfraktion der Tumorzellen (siehe Tabelle 11 und Diagramm 5).

	BMP2/ Aktin	BMPR-II/ Aktin	Smad4/ Aktin	CK19/ Aktin
Positiv > Negativ	16	13	1	16
Negativ > Positiv	5	8	20	5

Tabelle 11: Vergleich der **relativen** cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben

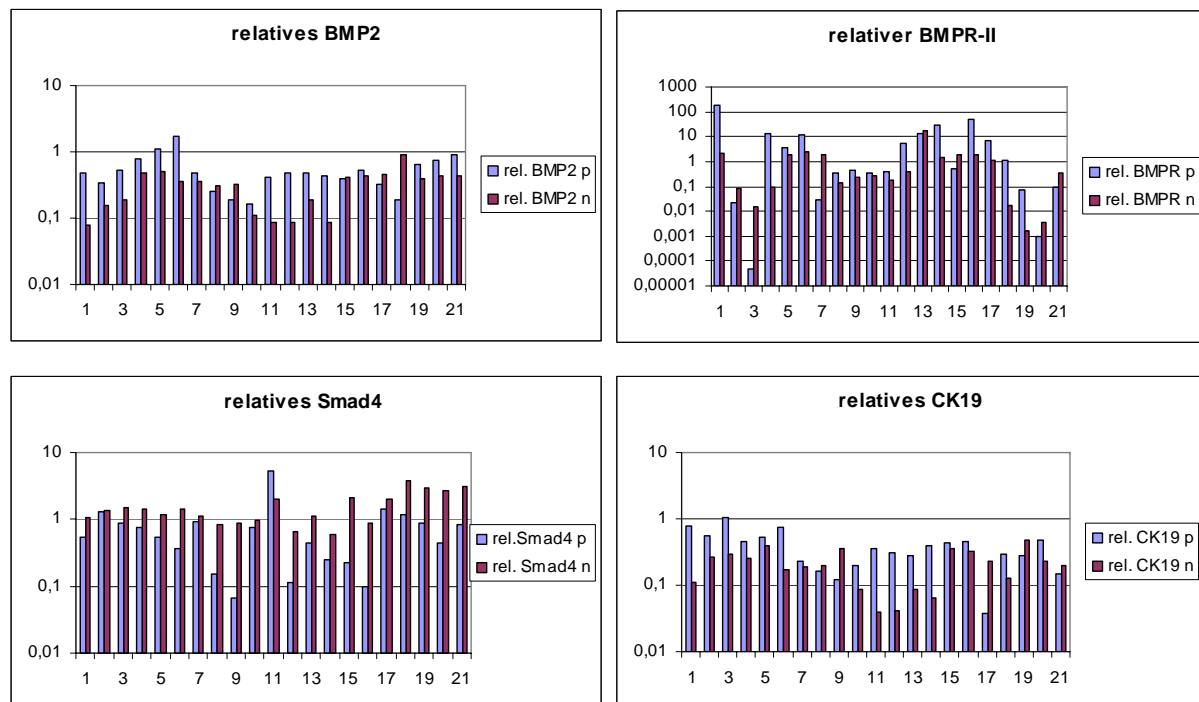


Diagramm 5: Vergleich der **relativen** cDNA- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Patientinnen- Proben

4.3.3. Auswertung der absoluten und relativen RNA- Konzentrationen der gesunden Probandinnen

Die Proben der fünf gesunden Probandinnen wurden auf die gleiche Weise wie die Proben der Patientinnen zunächst absolut und dann relativ ausgewertet. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 12 und Diagramm 6 sowie Tabelle 13 und Diagramm 7).

	Aktin	BMP2	BMPR-II	Smad4	CK19
Positiv > Negativ	3	3	1	0	5
Negativ > Positiv	2	2	4	5	0

Tabelle 12: Vergleich der **absoluten** cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen

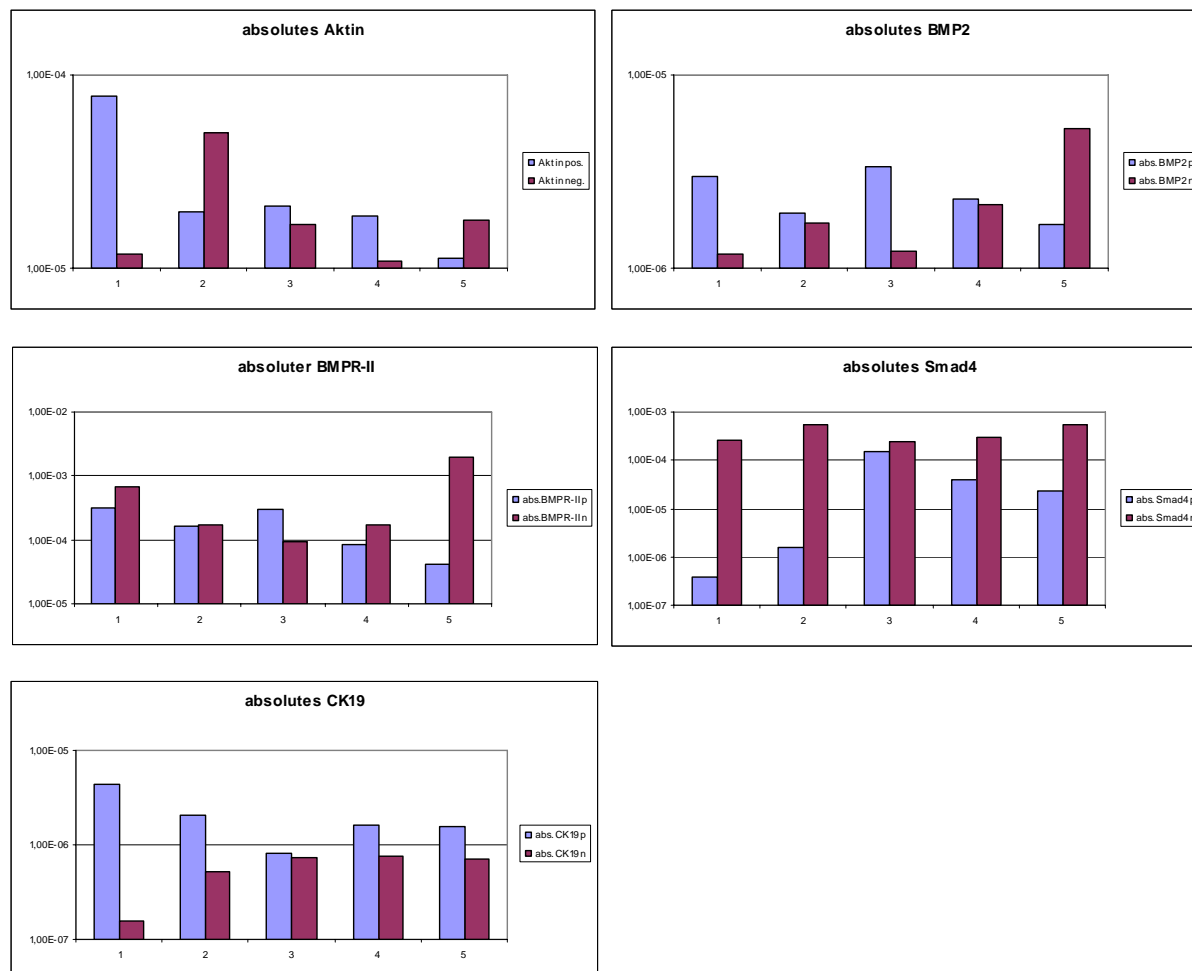


Diagramm 6: Vergleich der **absoluten** cDNA- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Proben gesunder Probandinnen

	BMP2/ Aktin	BMPR-II/ Aktin	Smad4/ Aktin	CK19/ Aktin
Positiv > Negativ	2	2	0	4
Negativ > Positiv	3	3	5	1

Tabelle 13: Vergleich der **relativen** cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen

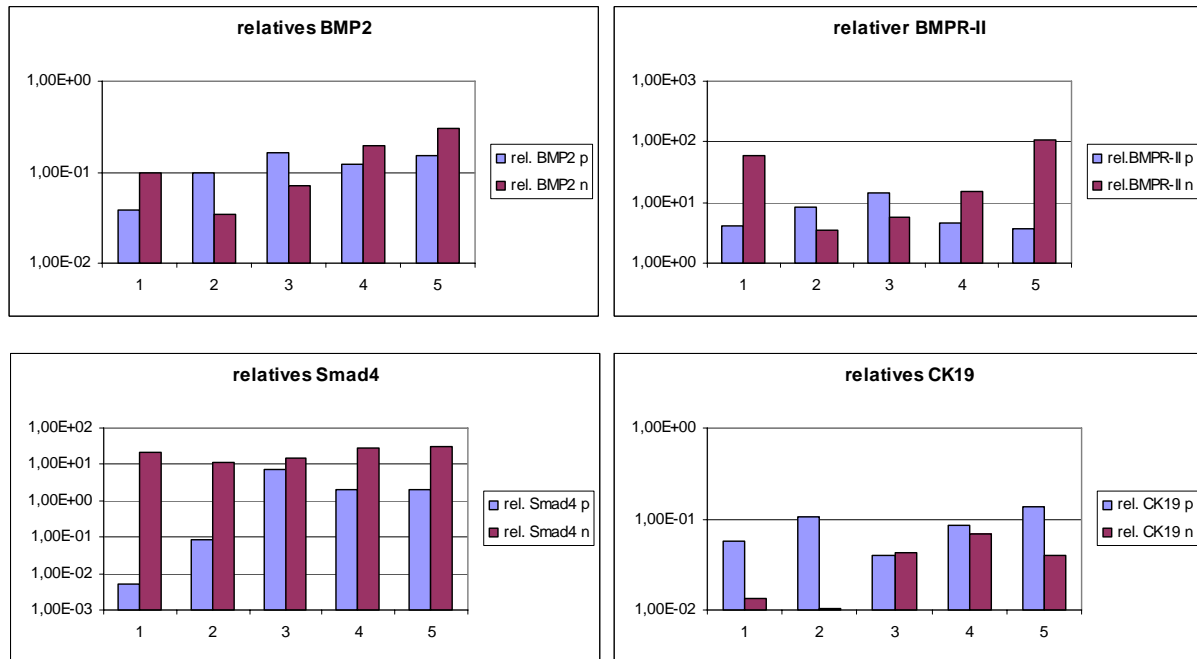


Diagramm 7: Vergleich der **relativen** cDNA- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Proben gesunder Probandinnen

4.3.4. Vergleich der RNA- Konzentrationen von Patientinnen und Probandinnen

Um die absoluten und relativen RNA- Werte besser untereinander in Relation stellen zu können, wurden die Mittelwerte der absoluten und relativen Konzentrationen von Patientinnen und Probandinnen in je einem Diagramm verglichen (siehe Diagramm 8 und Diagramm 9). Dabei wurden sowohl die Konzentrationen insgesamt als auch die Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen miteinander verglichen.

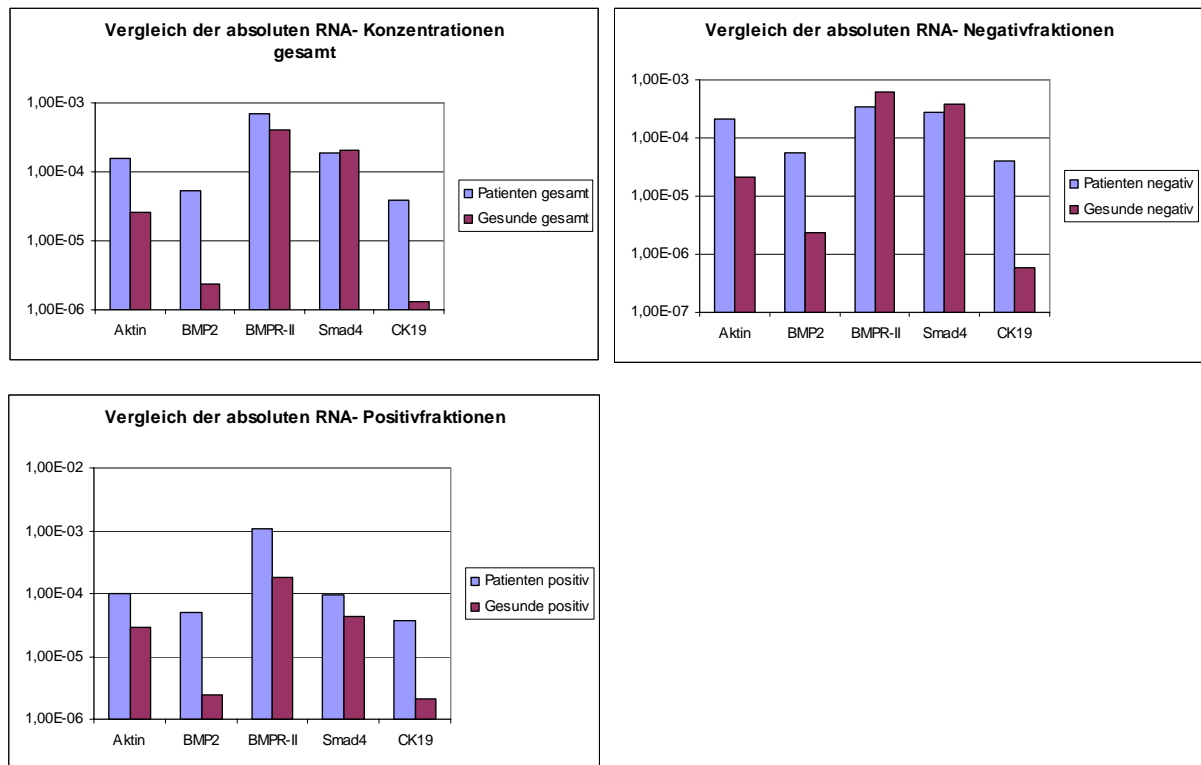


Diagramm 8: Mittelwerte der **absoluten** RNA-Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- (blaue Balken) und in Negativfraktionen (rote Balken)

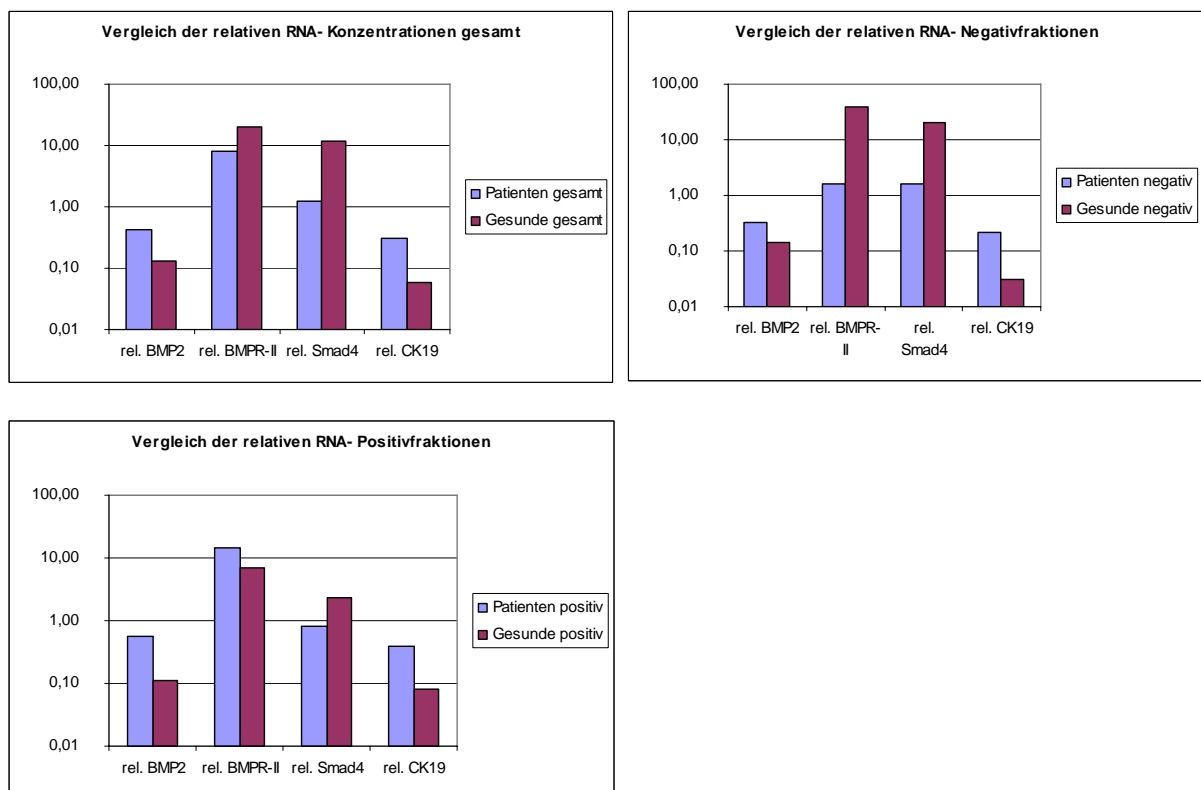


Diagramm 9: Mittelwerte der **relativen** RNA-Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- (blaue Balken) und in Negativfraktionen (rote Balken)

Des Weiteren wurde der Quotient aus Patienten- und Probandinnenkonzentration gebildet (siehe Formel 6), um so einen Faktor zu erhalten, wie viel mehr oder weniger eines Gens absolut oder relativ von den Zellen der Patientinnen gebildet wurde im Vergleich mit den gesunden Probandinnen (siehe Tabelle 14 und Tabelle 15).

$$\text{Faktor RNA} = \frac{\text{Patientinnen- RNA- Konzentration gesamt, positiv oder negativ}}{\text{Probandinnen- RNA- Konzentration gesamt, positiv oder negativ}}$$

Formel 6: Berechnung eines Faktors zum Vergleich der Patientinnen- und Probandinnen- RNA-Konzentrationen absolut und relativ

	Pat. gesamt	Ges. gesamt	Pat/Ges gesamt	Pat. negativ	Ges. negativ	Pat/Ges negativ	Pat. positiv	Ges. positiv	Pat/Ges positiv
Aktin	1,59E-4	2,56E-5	6,21	2,17E-4	2,16E-5	10,05	1,01E-4	2,96E-5	3,41
BMP2	5,35E-5	2,37E-6	22,75	5,60E-5	2,30E-6	24,35	5,11E-5	2,44E-6	20,94
BMPR	7,11E-4	3,98E-4	1,79	3,45E-4	6,13E-4	0,56	1,08E-3	1,82E-4	5,93
Smad4	1,88E-4	2,10E-4	0,90	2,84E-4	3,76E-4	0,76	9,29E-5	4,37E-5	2,13
CK19	3,89E-5	1,33E-6	29,25	4,04E-5	5,73E-7	70,51	3,74E-5	2,09E-6	17,89

Tabelle 14: Vergleich der Mittelwerte der **absoluten** RNA- Konzentrationen von Patientinnen (Pat.) und Gesunden (Ges.) gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion

	Pat. gesamt	Ges. gesamt	Pat/Ges gesamt	Pat. negativ	Ges. negativ	Pat/Ges negativ	Pat. positiv	Ges. positiv	Pat/Ges positiv
Rel. BMP2	0,43	0,13	3,31	0,32	0,14	2,29	0,55	0,11	5,00
Rel. BMPR	8,21	19,61	0,42	1,63	38,58	0,04	14,79	7,01	2,11
Rel. Smad4	1,21	11,59	0,10	1,59	20,86	0,08	0,83	2,32	0,36
Rel. CK19	0,31	0,06	5,17	0,21	0,03	7,00	0,40	0,08	5,00

Tabelle 15: Vergleich der Mittelwerte der **relativen** RNA- Konzentrationen von Patientinnen (Pat.) und Gesunden (Ges.) gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion

Bezüglich der absoluten Konzentrationen zeigte sich, dass die Patientenproben sowohl insgesamt als auch in der Positiv- und der Negativfraktion höhere Konzentrationen an Aktin, BMP2 und CK19 aufwiesen. Dabei fällt besonders auf, dass BMP2 und CK19 um ein Vielfaches mehr in den Patientinnenproben als in den Probandinnenproben (Faktor

20,94 bis 24,35 für BMP2 und Faktor 17,89 bis 70,51 für CK19) gebildet wurden (siehe Diagramm 8 und Tabelle 14).

Absolut wurde Smad4 insgesamt und in der Negativfraktion weniger von den Patientinnen- als von den Probandinnenzellen gebildet (Faktor 0,76 bis 0,90) und BMPR-II wurde in der Negativfraktion der Patientinnen nur halb so viel gebildet wie in der Negativfraktion der gesunden Probandinnen (Faktor 0,56) (siehe Diagramm 8 und Tabelle 14).

Bezüglich der relativen Konzentrationen zeigte sich, dass in den Patientinnenproben im Vergleich zu Aktin mehr BMP2 und CK19 gebildet wurde als in den Probandinnenproben (Faktor 3,31 bis 5,00 für rel. BMP2 und Faktor 5,00 bis 7,00 für rel. CK19). Das relative Smad4 dagegen wurde in den Patientinnenproben weniger exprimiert als in den Probandinnenproben (Faktor 0,08 bis 0,36) und BMPR-II wurde insgesamt und in der Negativfraktion von den Patientinnenzellen weniger gebildet als von den Probandinnenzellen (Faktor 0,04 bis 0,42), in der Positivfraktion allerdings in den Patientinnenproben mehr als in den Probandinnenproben exprimiert (Faktor 2,11) (siehe Diagramm 9 und Tabelle 15)

4.3.5. Statistische Auswertung der RNA- Ergebnisse

Die relativen Werte der cDNA- Konzentrationen von Probandinnen und Patientinnen wurden mit Hilfe des Chi- Quadrat- Tests auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Dabei wurden folgende Werte miteinander verglichen: Positiv- oder Negativfraktion, Erkrankung am Mammakarzinom, TNM- Status, Stadium, Grading und der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteron-, sowie Her2/neu- Rezeptor) jeweils mit den absoluten Aktin- und relativen BMP2-, Smad4-, und CK19- Konzentrationen. Weiterhin wurden die Erkrankung und das Stadium mit dem Hormonrezeptorstatus und die Tumorart mit dem Alter verglichen. Es wurden jeweils die p- Werte ermittelt und somit die Signifikanz bestimmt. Als signifikant angesehen wurden p- Werte $< 0,05$, als beachtenswert wurden p- Werte $< 0,1$ betrachtet. Es ergaben sich folgende p- Werte und deren Beurteilungen (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17).

Verglichen	p- Wert	Beurteilung
Fraktion- Aktin	0,001	signifikant
Fraktion- rel. BMP2	0,010	signifikant
Fraktion- rel. Smad4	0,001	signifikant
Fraktion- rel. CK19	0,001	signifikant
Erkrankung- Aktin	0,001	signifikant
Erkrankung- rel. BMP2	0,008	signifikant
Erkrankung- rel. Smad4	0,029	signifikant
Erkrankung- rel. CK19	0,569	Nicht signifikant
Erkrankung- ER	0,010	signifikant
Erkrankung- PR	0,086	beachtenswert
Erkrankung- Her2/neu	0,019	signifikant
Erkrankung- Alter	0,001	signifikant
T- Aktin	0,634	Nicht signifikant
T- rel. BMP2	0,004	signifikant
T- rel. Smad4	0,947	Nicht signifikant
T- rel. CK19	0,173	Nicht signifikant
N- Aktin	0,330	Nicht signifikant
N- rel. BMP2	0,001	signifikant
N- rel. Smad4	0,742	Nicht signifikant
N- rel. CK19	0,432	Nicht signifikant
M- Aktin	0,911	Nicht signifikant
M- rel. BMP2	0,687	Nicht signifikant
M- rel. Smad4	0,777	Nicht signifikant
M- rel. CK19	0,134	Nicht signifikant
Stadium - Aktin	0,578	Nicht signifikant
Stadium - rel. BMP2	0,002	signifikant
Stadium - rel. Smad4	0,777	Nicht signifikant
Stadium - rel. CK19	0,052	signifikant
Stadium - ER	0,080	beachtenswert
Stadium - PR	0,035	signifikant
Stadium- Her2/neu	0,016	signifikant
Grading- Aktin	0,023	signifikant
Grading- rel. BMP2	0,307	Nicht signifikant
Grading- rel. Smad4	0,036	signifikant
Grading- rel. CK19	0,416	Nicht signifikant

Tabelle 16: statistische Auswertung der relativen (rel.) RNA- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz

Verglichen	p- Wert	Beurteilung
ER- Aktin	0,322	Nicht signifikant
ER- rel. BMP2	0,389	Nicht signifikant
ER- rel. Smad4	0,304	Nicht signifikant
ER- rel. CK19	0,432	Nicht signifikant
PR- Aktin	0,328	Nicht signifikant
PR- rel. BMP2	0,800	Nicht signifikant
PR- rel. Smad4	0,490	Nicht signifikant
PR- rel. CK19	0,401	Nicht signifikant
Her2/neu - Aktin	0,817	Nicht signifikant
Her2/neu - rel. BMP2	0,179	Nicht signifikant
Her2/neu - rel. Smad4	0,346	Nicht signifikant
Her2/neu - rel. CK19	0,853	Nicht signifikant

Tabelle 17: statistische Auswertung der relativen (rel.) RNA- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz (Fortsetzung)

4.4. Ergebnisse der Protein- Analyse

Nachdem die Proteine mittels SDS- Page und Western- Blot auf die Blot- Membran gebracht worden waren, wurden sie mit dem lumineszierenden ECL- Reagenz unter dem Luminescent Image Analyzer (LAS) sichtbar gemacht. Je nach Stärke der Chemolumineszenz zeigten sich stärkere oder schwächere Banden für die jeweiligen Proteine und Fraktionen (siehe Abbildung 13).

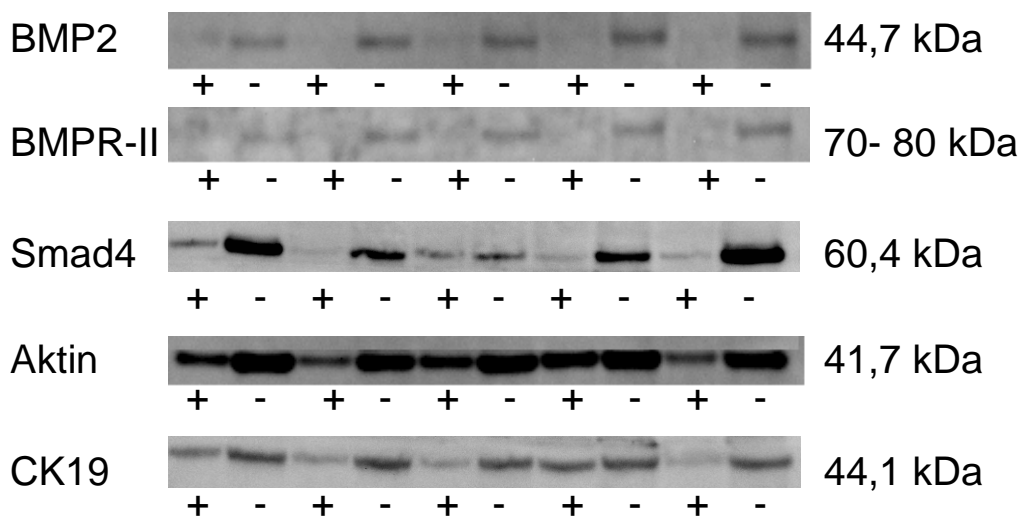


Abbildung 13: Bilder der Blotmembranen der untersuchten Proteine BMP2, BMPR-II, Smad4, Aktin und CK19 (die Positiv- und Negativfraktionen sind mit + und – gekennzeichnet, die Proteingrößen sind in Kilo-Dalton (kDa) angegeben)

Diese LAS- Bilder wurden mit Hilfe des AIDA- Auswertungsprogramms ausgewertet. Dabei wurden den unterschiedlichen Schwärzungsgraden der Proteinbanden Werte zugeordnet. Je schwärzer die Bande, desto höher der Wert. Die Werte sind dabei proportional zur Proteinkonzentration. Damit sind die Konzentrationen anhand dieser Werte untereinander vergleichbar.

4.4.1. Auswertung der absoluten Protein- Konzentrationen der Patientinnen

Zunächst wurden wie bei der RNA- Analyse die absoluten Proteinkonzentrationen der Positiv- und Negativfraktionen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass Aktin in 11 von 21 Fällen und BMPR-II in 12 von 21 Fällen in der positiven Tumorzellfraktion eine höhere Konzentration aufwiesen. Smad4 zeigte dagegen in zwei, CK19 in einem und BMP2 in drei von 21 Fällen eine höhere Konzentration in der Negativfraktion (siehe Tabelle 18 und Diagramm 10). Besonders auffällig war, dass die Proben 17 bis 21 für die Proteine BMP2, BMPR-II und CK19 sehr niedrige Konzentrationen aufwiesen. Das könnte daran liegen, dass diese Proben gemeinsam in einem Western Blot untersucht wurden und evtl. ein Membranfehler oder ein Fehler im Chemolumineszenz- Verfahren vorlag.

	Aktin	BMP2	BMPR-II	Smad4	CK19
Positiv > Negativ	11	3	12	2	1
Negativ > Positiv	10	18	9	19	20

Tabelle 18: Vergleich der **absoluten** Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben

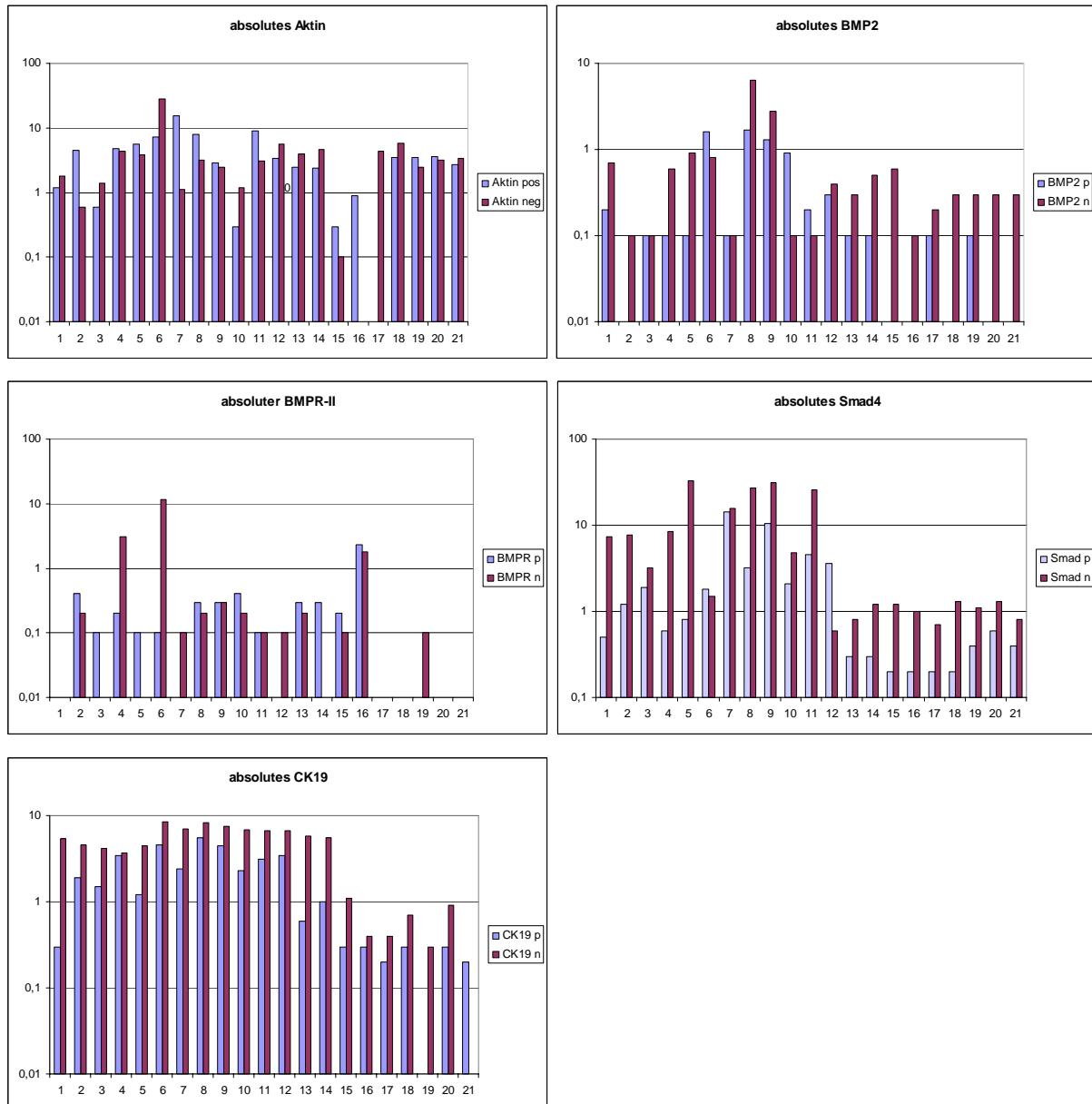


Diagramm 10: Vergleich der **absoluten** Protein- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Patientinnen- Proben

4.4.2. Auswertung der relativen Protein- Konzentrationen der Patientinnen

Nun wurden auch die relativen Konzentrationen von BMP2, BMPR-II, Smad4 und CK19 miteinander verglichen und es zeigte sich, dass BMP2 und Smad4 in acht von 21 Proben in der Positivfraktion eine höhere relative Konzentration aufwiesen als in der Negativfraktion, bei BMPR-II war dies in 12 von 21 und bei CK19 in 4 von 21 Proben der Fall (siehe Tabelle 19 und Diagramm 11).

	BMP2/ Aktin	BMPR-II/ Aktin	Smad4/ Aktin	CK19/ Aktin
Positiv > Negativ	8	12	8	4
Negativ > Positiv	13	9	13	17

Tabelle 19: Vergleich der **relativen** Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben

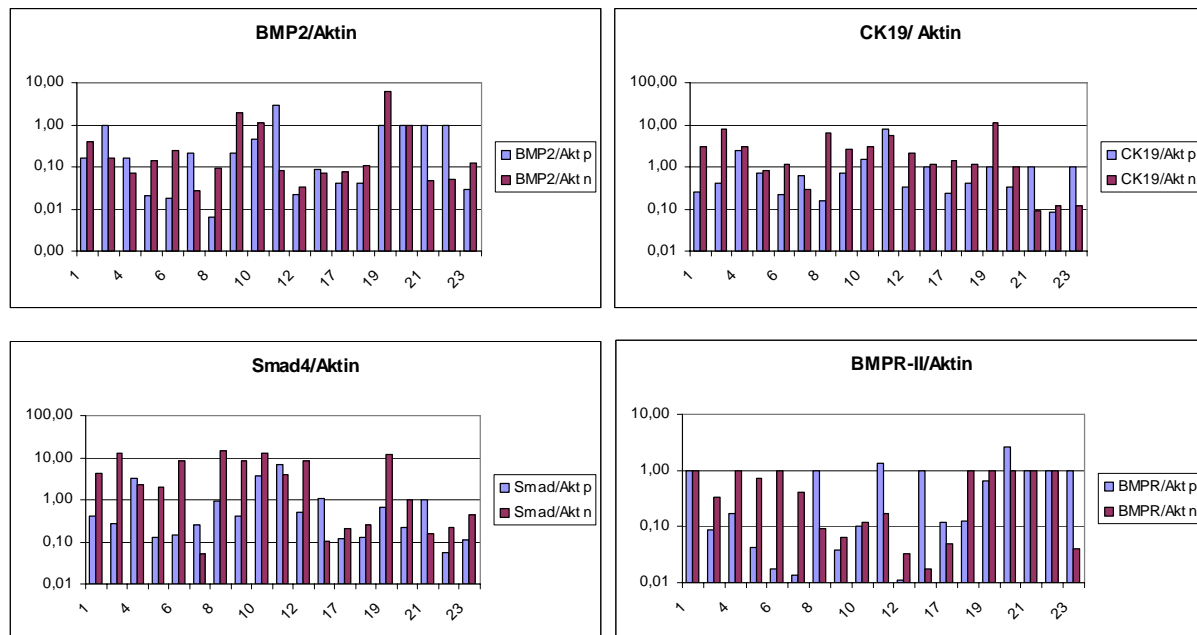


Diagramm 11: Vergleich der **relativen** Protein- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Patientinnen- Proben

4.4.3. Auswertung der absoluten und relativen Protein- Konzentrationen der gesunden Probandinnen

Danach wurden auch die Proteinproben der fünf gesunden Probandinnen auf die gleiche Weise wie die Proben der Patientinnen zunächst absolut und dann relativ ausgewertet. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 20 und Diagramm 12 sowie Tabelle 21 und Diagramm 13).

	Aktin	BMP2	BMPR-II	Smad4	CK19
Positiv > Negativ	2	2	2	0	1
Negativ > Positiv	3	3	3	5	4

Tabelle 20: Vergleich der **absoluten** Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen

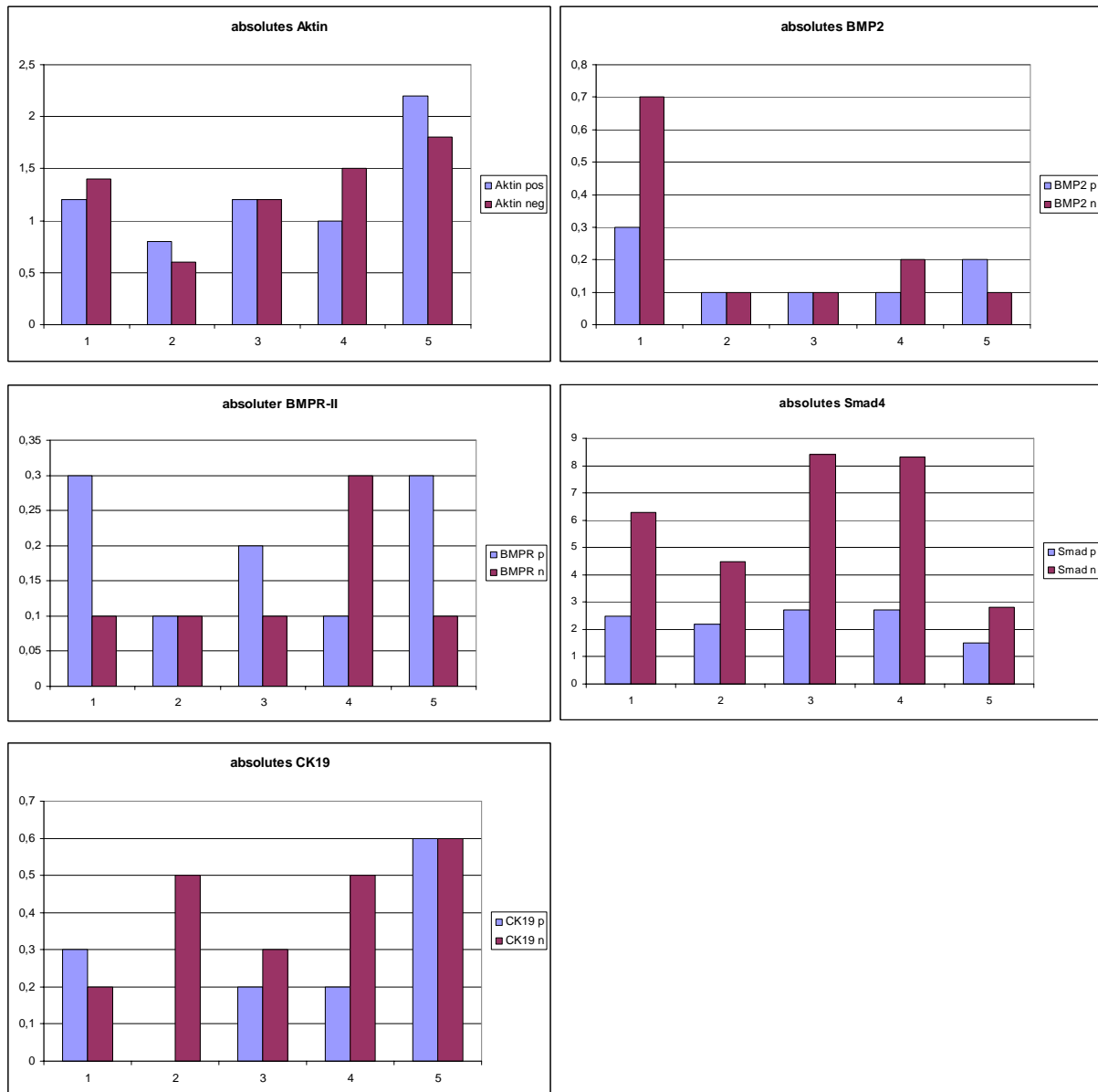


Diagramm 12: Vergleich der **absoluten** Protein- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Proben gesunder Probandinnen

	BMP2/ Aktin	BMPR-II/ Aktin	Smad4/ Aktin	CK19/ Aktin
Positiv > Negativ	2	3	0	1
Negativ > Positiv	3	2	5	4

Tabelle 21: Vergleich der **relativen** Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen

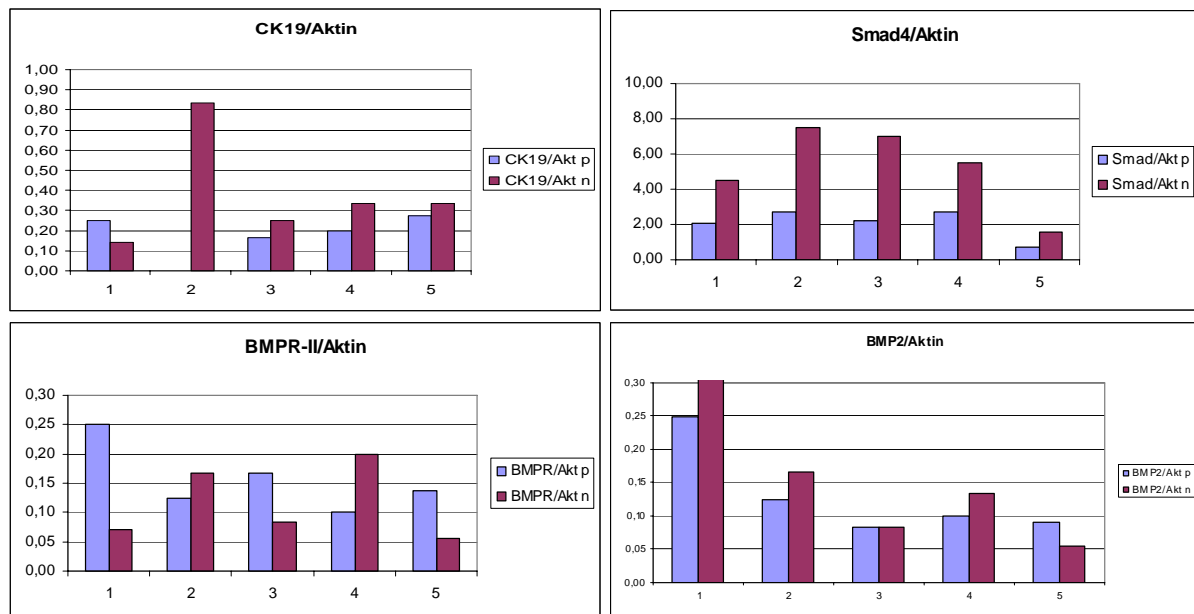


Diagramm 13: Vergleich der **relativen** Protein- Konzentrationen in Positiv- (blaue Balken) und Negativfraktionen (rote Balken) von Proben gesunder Probandinnen

4.4.4. Vergleich der Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Probandinnen

Um die absoluten und relativen Protein- Werte besser untereinander in Relation stellen zu können, wurden, wie bei der RNA- Analyse, die Mittelwerte der absoluten und relativen Konzentrationen von Patientinnen und Probandinnen in je einem Diagramm verglichen (siehe Diagramm 14 und 15). Dabei wurden sowohl die Konzentrationen insgesamt als auch die Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen miteinander verglichen.

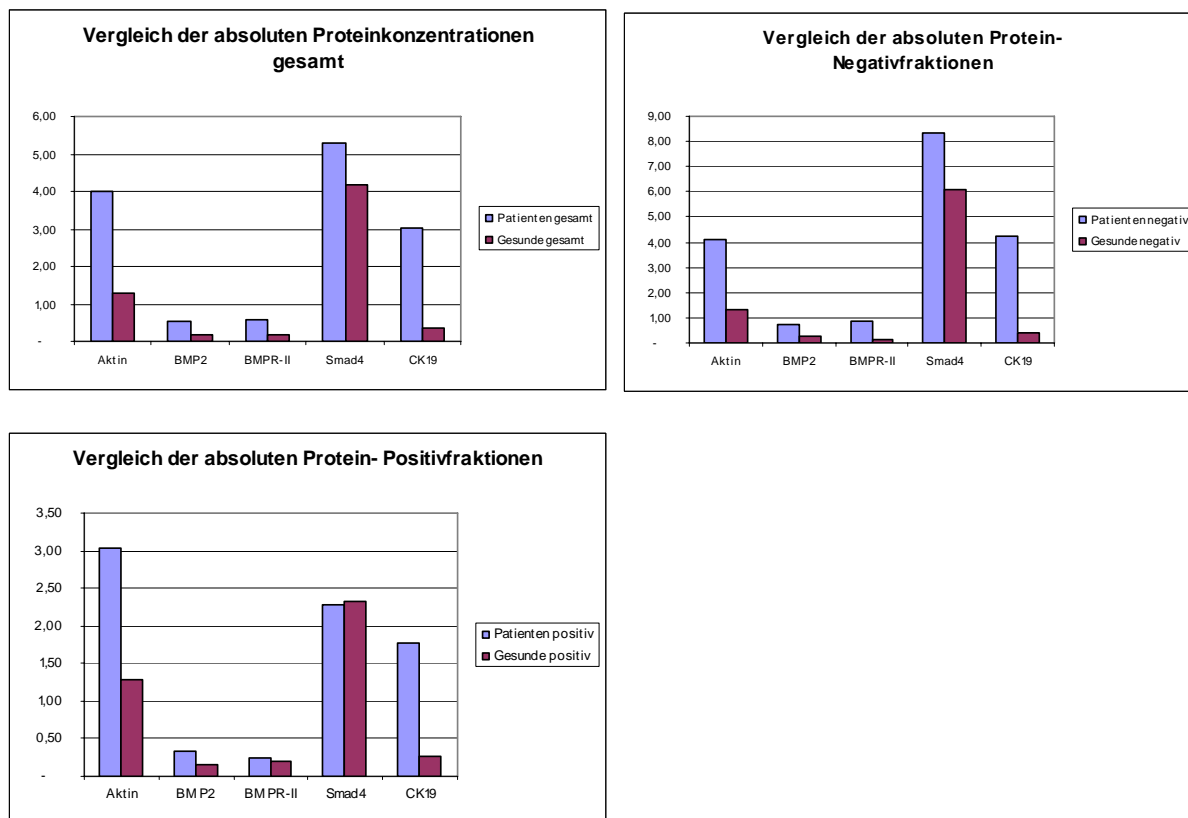


Diagramm 14: Mittelwerte der **absoluten** Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- (blaue Balken) und in Negativfraktionen (rote Balken)

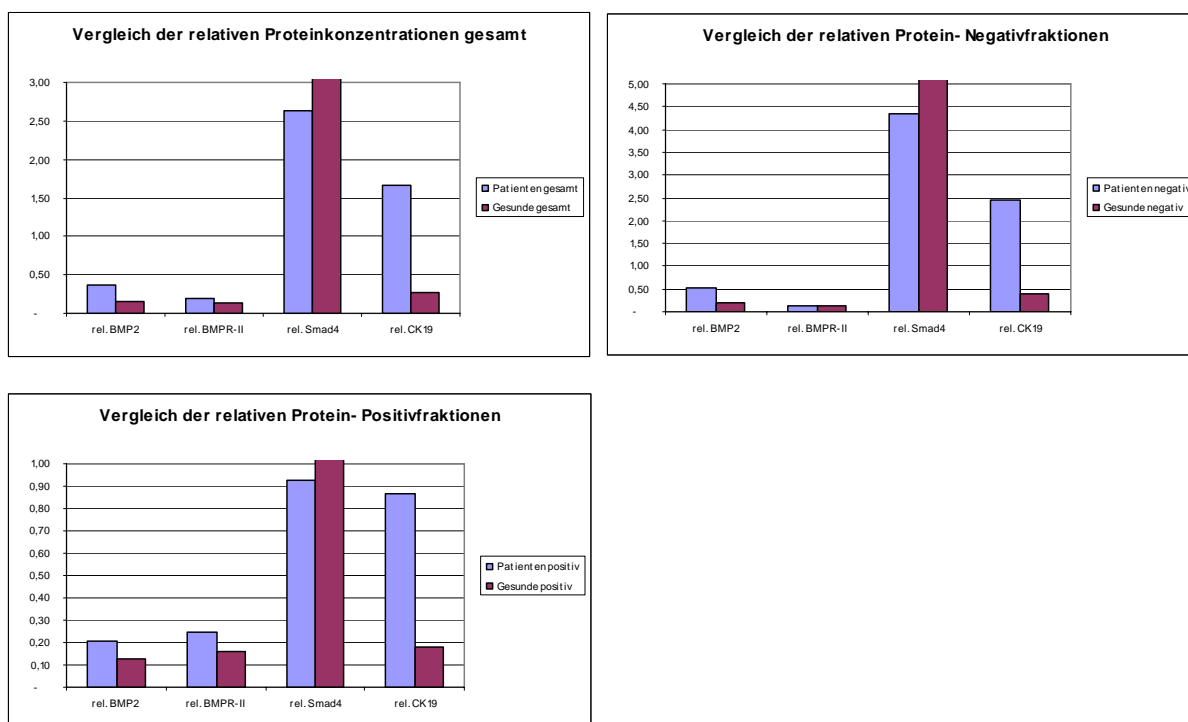


Diagramm 15: Mittelwerte der **relativen** Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- (blaue Balken) und in Negativfraktionen (rote Balken)

Des Weiteren wurde der Quotient aus Patientinnen- und Probandinnenkonzentration gebildet (siehe Formel 7), um so einen Faktor zu erhalten, wie viel mehr oder weniger von einem Protein absolut oder relativ von den Zellen der Patientinnen gebildet wurde im Vergleich mit den gesunden Probandinnen (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23).

$$\text{Faktor Protein} = \frac{\text{Patientinnen- Protein- Konzentration gesamt, positiv oder negativ}}{\text{Probandinnen- Protein- Konzentration gesamt, positiv oder negativ}}$$

Formel 7: Berechnung eines Faktors zum Vergleich der Patientinnen- und Probandinnen- Protein-Konzentrationen absolut und relativ

	Pat. gesamt	Ges. gesamt	Pat/Ges gesamt	Pat. negativ	Ges. negativ	Pat/Ges negativ	Pat. positiv	Ges. positiv	Pat/Ges positiv
Aktin	4,00	1,29	3,10	4,07	1,30	3,13	3,03	1,28	2,37
BMP2	0,54	0,20	2,70	0,76	0,24	3,17	0,33	0,16	2,06
BMPR	0,56	0,17	3,29	0,87	0,14	6,21	0,24	0,20	1,20
Smad4	5,30	4,19	1,26	8,32	6,06	1,37	2,28	2,32	0,98
CK19	3,01	0,34	8,85	4,23	0,42	10,07	1,77	0,26	6,81

Tabelle 22: Vergleich der Mittelwerte der **absoluten** Protein- Konzentrationen von Patientinnen (Pat.) und Gesunden (Ges.) gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion

	Pat. gesamt	Ges. gesamt	Pat/Ges gesamt	Pat. negativ	Ges. negativ	Pat/Ges negativ	Pat. positiv	Ges. positiv	Pat/Ges positiv
Rel. BMP2	0,37	0,16	2,31	0,52	0,19	2,74	0,21	0,13	1,62
Rel. BMPR	0,20	0,14	1,43	0,14	0,12	1,17	0,25	0,16	1,56
Rel. Smad4	2,63	3,66	0,72	4,34	5,22	0,83	0,93	2,09	0,44
Rel. CK19	1,66	0,28	5,93	2,44	0,38	6,42	0,87	0,18	4,83

Tabelle 23: Vergleich der Mittelwerte der **relativen** Protein- Konzentrationen von Patientinnen (Pat.) und Gesunden (Ges.) gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion

Bezüglich der absoluten Protein- Konzentrationen zeigte sich, dass alle Proteine bis auf Smad4 vermehrt in der Proben der Patientinnen exprimiert wurden, und zwar sowohl insgesamt als auch in der Positiv und der Negativfraktion (Faktor 2,37 bis 3,13 für Aktin,

Faktor 2,06 bis 3,17 für BMP2, Faktor 1,20 bis 6,21 für BMPR-II und Faktor 6,81 bis 8,85 für CK19) (siehe Diagramm 14 und Tabelle 21).

Die absolute Smad4- Konzentration lag insgesamt und in der Negativfraktion in den Patientinnenproben höher als in der Probandinnenproben (Faktor 1,26 bis 1,37), in der Positivfraktion war die Smad4- Konzentration in Patientinnen- und Probandinnenproben fast identisch (Faktor 0,98) (siehe Diagramm 14 und Tabelle 21).

Die auf Aktin abgeglichenen relativen Konzentrationen zeigten im Vergleich, dass BMP2, BMPR-II und CK19 in den Patientinnenproben deutlich mehr exprimiert wurden als in den Probandinnenproben (Faktor 1,62 bis 2,74 für rel. BMP2, Faktor 1,17 bis 1,56 für rel. BMPR-II und Faktor 4,83 bis 6,42 für rel. CK19). Das relative Smad4 dagegen zeigte in den Probandinnenproben eine höhere Konzentration (Faktor 0,44 bis 0,83) (siehe Diagramm 15 und Tabelle 22).

4.4.5. Statistische Auswertung der Protein- Ergebnisse

Die relativen Werte der Proteinkonzentrationen wurden wie die relativen RNA-Konzentrationen mittels SPSS auf ihre Signifikanz geprüft. Dabei wurden die gleichen Werte untereinander verglichen wie bei der RNA (siehe Kapitel 4.2). Als signifikant wurden p- Werte $< 0,05$ bewertet, als beachtenswert wurden aber auch p- Werte $< 0,1$ angesehen. Es ergaben sich für die relativen Proteinkonzentrationen folgende p- Werte und deren Beurteilungen (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25):

Verglichen	p- Wert	Beurteilung
Fraktion- Aktin	1,000	nicht signifikant
Fraktion- rel. BMP2	0,095	beachtenswert
Fraktion- rel. Smad4	0,254	nicht signifikant
Fraktion- rel. CK19	0,051	Signifikant
Erkrankung- Aktin	0,003	Signifikant
Erkrankung- rel. BMP2	0,011	Signifikant
Erkrankung- rel. Smad4	0,005	Signifikant
Erkrankung- rel. CK19	0,015	Signifikant
Erkrankung- ER	0,001	Signifikant
Erkrankung- PR	0,005	signifikant
Erkrankung- Her2/neu	0,005	Signifikant
Erkrankung- Alter	0,001	Signifikant
T- Aktin	0,765	nicht signifikant
T- rel. BMP2	0,812	nicht signifikant
T- rel. Smad4	0,129	nicht signifikant
T- rel. CK19	0,721	nicht signifikant
N- Aktin	0,051	Signifikant
N- rel. BMP2	0,335	nicht signifikant
N- rel. Smad4	0,107	nicht signifikant
N- rel. CK19	0,126	nicht signifikant
M- Aktin	0,746	nicht signifikant
M- rel. BMP2	0,872	nicht signifikant
M- rel. Smad4	0,118	nicht signifikant
M- rel. CK19	0,809	nicht signifikant
Stadium - Aktin	0,175	nicht signifikant
Stadium - rel. BMP2	0,330	nicht signifikant
Stadium - rel. Smad4	0,079	Beachtenswert
Stadium - rel. CK19	0,209	nicht signifikant
Stadium - ER	0,041	Signifikant
Stadium - PR	0,018	Signifikant
Stadium- Her2/neu	0,924	nicht signifikant
Grading- Aktin	0,424	nicht signifikant
Grading- rel. BMP2	0,054	Beachtenswert
Grading- rel. Smad4	0,172	nicht signifikant
Grading- rel. CK19	0,974	nicht signifikant

Tabelle 24: statistische Auswertung der relativen (rel.) Protein- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz

Verglichen	p- Wert	Beurteilung
ER- Aktin	0,076	Beachtenswert
ER- rel. BMP2	0,005	Signifikant
ER- rel. Smad4	0,065	Beachtenswert
ER- rel. CK19	0,730	nicht signifikant
PR- Aktin	0,143	nicht signifikant
PR- rel. BMP2	0,031	Signifikant
PR- rel. Smad4	0,444	nicht signifikant
PR- rel. CK19	0,930	nicht signifikant
Her2/neu - Aktin	0,790	nicht signifikant
Her2/neu - rel. BMP2	0,660	nicht signifikant
Her2/neu - rel. Smad4	0,031	Signifikant
Her2/neu - rel. CK19	0,001	Signifikant

Tabelle 25: statistische Auswertung der relativen (rel.) Protein- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz (Fortsetzung)

4.5. Vergleich der RNA- und Proteinkonzentrationen

Im Anschluss an die Auswertung der RNA- und Proteinkonzentrationen wurden nun die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei wurden nur die relativen Werte beachtet, da die absoluten Werte aufgrund unterschiedlicher Konzentrationseinheiten nicht vergleichbar waren. Bei den relativen Werten kürzten sich die Einheiten durch den Abgleich auf Aktin weg. Aufgrund zu geringer Probenvolumen war es leider nicht möglich, einen direkten Vergleich der RNA und Proteinkonzentrationen in einer Probe anzustellen. Daher wurden für diese Berechnungen alle RNA- und Proteinkonzentrationen zusammengekommen, jeweils die Mediane der relativen Positiv- und Negativfraktionen bestimmt und der Quotient aus RNA- und Proteinkonzentrationsmittelwert je derselben Fraktion gebildet. Dies wurde sowohl für die Patientinnen- als auch für die Probandinnenproben durchgeführt (siehe Tabelle 26 und Tabelle 27). Wenn der Wert des Quotienten RNA- Konzentration / Proteinkonzentration größer als 1 war, wurde mehr RNA als Proteine gebildet und umgekehrt. Wegen der starken Schwankungen der BMPR-II-Konzentrationen (siehe oben) wurden diese bei dem Vergleich außer Acht gelassen.

Mediane der Konzentrationen	Patientinnen		
	RNA	Proteine	RNA/Proteine
BMP2 relativ Positivfraktion	0,47944423	0,02	2,40E+01
BMP2 relativ Negativfraktion	0,35218045	0,09	3,91E+00
Smad4 relativ Positivfraktion	0,53246463	0,25	2,13E+00
Smad4 relativ Negativfraktion	1,37584979	1,93	7,13E-01
CK19 relativ Positivfraktion	0,31331423	0,34	9,22E-01
CK19 relativ Negativfraktion	0,19980411	1,18	1,69E-01

Tabelle 26: Vergleich der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen der Patientinnenproben

Mediane der Konzentrationen	Probandinnen		
	RNA	Proteine	RNA/Proteine
BMP2 relativ Positivfraktion	1,22E-01	0,10	1,22E+00
BMP2 relativ Negativfraktion	9,99E-02	0,13	7,69E-01
Smad4 relativ Positivfraktion	2,10E+00	2,25	9,34E-01
Smad4 relativ Negativfraktion	2,19E+01	5,53	3,96E+00
CK19 relativ Positivfraktion	8,64E-02	0,20	4,32E-01
CK19 relativ Negativfraktion	3,96E-02	0,33	1,20E-01

Tabelle 27: Vergleich der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen der Probandinnenproben

Auffällig ist, dass die relative BMP2- RNA- Konzentration in der Positiv- und Negativfraktion der Patientinnen höher lag als die relative Proteinkonzentration. Auch wurde in der Positivfraktion der Patientinnen mehr Smad4- RNA als Proteine gebildet. Ansonsten wurden in den Patientinnenproben stets mehr Proteine als RNA produziert. Bei den Probandinnenproben ist interessant, dass in der Positiv- und Negativfraktion nahezu gleichviel BMP2- Proteine wie -RNA gebildet wurden und dass die relative Smad4- RNA- Konzentration in der Negativfraktion größer war als die Proteinkonzentration. Ansonsten wurden auch hier stets mehr Proteine als RNA exprimiert.

4.6. Ergebnisse der Auswertung des Hormonrezeptor- Status und des Her2/neu- Status

Anhand der klinischen Daten der Patientinnen wurde der Östrogen- und Progesteronrezeptor- Status sowie der Her2/neu- Status der Patientinnen überprüft. Dabei zeigte sich, dass eine ER- Positivität in 69% und eine PR- Positivität in 42% der Fälle vorlag. Her2/neu wurde ebenfalls von 42% der Tumoren exprimiert.

Weiterhin wurden die Patientinnen für alle drei Rezeptoren in rezeptorpositive und rezeptornegative Gruppen eingeteilt. Dadurch sollte ein Zusammenhang der Rezeptorexpression mit der Produktion von BMP2, Smad4 und CK19 auf RNA- und Proteinebene untersucht werden. Es wurden hierfür die Mediane der auf Aktin abgeglichenen Konzentrationswerte genutzt. Der BMP- Rezeptor Typ 2 wurde aufgrund der sehr uneinheitlichen Ergebnisse (siehe oben) bei diesen Berechnungen außer Acht gelassen (siehe Tabelle 28, Tabelle 29 und Tabelle 30)

	RNA		Proteine	
	ER positiv	ER negativ	ER positiv	ER negativ
BMP2/Aktin	4,25E-01	3,84E-01	0,05	0,11
Smad4/Akt.	8,28E-01	1,21E+00	0,44	0,25
CK19/Akt.	2,48E-01	2,87E-01	0,02	0,04

Tabelle 28: Vergleich der Mediane der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen von Östrogenrezeptor- (ER) positiven und –negativen Patientinnen

	RNA		Proteine	
	PR positiv	PR negativ	PR positiv	PR negativ
BMP2/Aktin	4,03E-01	3,86E-01	0,05	0,17
Smad4/Akt.	8,73E-01	9,19E-01	0,41	0,25
CK19/Akt.	2,74E-01	2,29E-01	0,02	0,04

Tabelle 29: Vergleich der Mediane der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen von Progesteronrezeptor- (PR) positiven und –negativen Patientinnen

	RNA		Proteine	
	Her2/neu positiv	Her2/neu negativ	Her2/neu positiv	Her2/neu negativ
BMP2/Aktin	4,37E-01	3,54E-01	0,09	0,04
Smad4/Akt.	8,74E-01	8,93E-01	1,06	0,20
CK19/Akt.	2,28E-01	2,93E-01	0,04	0,00

Tabelle 30: Vergleich der Mediane der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen von Her2/neu-positiven und –negativen Patientinnen

Es fällt auf, dass die RNA- Konzentrationen in rezeptorpositiven und –negativen Gruppen nahezu gleich waren, bei den Proteinen zeigten sich aber deutliche, zum Teil auch statistisch relevante Unterschiede. Sowohl bei den Östrogenrezeptor- positiven als auch bei den Progesteronrezeptor- positiven Patientinnen wurde auf Proteinebene weniger relatives BMP2 und CK19, sowie mehr Smad4 gebildet als bei den rezeptornegativen Patientinnen. Für BMP2 ergab sich jeweils eine statistische Signifikanz (p- Werte: ER 0,005 und PR 0,031). Im Falle des Her2/neu- Rezeptors wurden auf Proteinebene bei positiven Patientinnen mehr relatives BMP2, CK19 und Smad4 gebildet. Hier ergab sich für CK19 und Smad4 eine statistische Signifikanz (p- Werte: Smad4 0,031 und CK19 0,001).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Aktin, CK19, BMP2, BMPR-II und Smad4 in disseminierten Zellen im Blut von Mammakarzinompatientinnen auf RNA- und Proteinebene untersucht und mit Proben von gesunden Probandinnen verglichen.

Um metastasieren zu können, muss ein Primärtumor mehrere Schritte durchlaufen. Zunächst braucht er die Fähigkeit zur Neoangiogenese, um Zellen überhaupt in das Gefäßsystem ausschwemmen zu können. Danach müssen einige Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, den Zellverband zu verlassen und in das Gefäßsystem einzudringen (Chambers et al. 2002). Um diese Eigenschaften zu erreichen, durchlaufen die Tumorzellen eine Art Dedifferenzierung. Es werden Proteine, die während der Embryogenese wichtig waren, reaktiviert und erfüllen nun neue Aufgaben bezüglich des Tumorwachstums (Clement und Wölfl 2004). Ein solches Protein ist BMP2. Daher sollte es in dieser Arbeit zusammen mit wichtigen Komponenten seines Signalweges, BMPR-II und Smad4, näher beleuchtet werden, um zu sehen, wie sich die Expression von BMP2 in disseminierten Tumorzellen gestaltet und ob der Signalweg verändert ist.

Weiterhin wurden die disseminierten Zellen auf ihren Gehalt an CK19 untersucht, einem epithelialen Marker, der seinerseits ebenfalls eine Rolle in der Tumorgenese zu spielen scheint (Parikh et al. 2006).

Es wurden Blutproben von insgesamt 42 Mammakarzinompatientinnen untersucht, 21 auf RNA- und 21 auf Proteinebene. Als Negativproben wurde zusätzlich das Blut von fünf gesunden Probandinnen jeweils auf RNA und Proteine untersucht.

Um die Ergebnisse der Experimente besser beurteilen zu können, sollen hier zunächst die angewendeten Methoden diskutiert werden.

Für die Untersuchungen der RNA wurde das LightCycler- System verwendet. Dieses System hat mehrere Vorteile gegenüber der RT-PCR. Es ist eine sehr schnelle Untersuchungsmethode mit einer sehr hohen Sensitivität trotz geringer Probenvolumina. Die Arbeitsgruppen um Smith und Benoy fanden heraus, dass es sensitiver ist als die Immunzytochemie (Benoy et al. 2004, Smith et al. 2000). Außerdem erfolgt die Konzentrationsbestimmung direkt durch die Software des LightCyclers, somit werden Fehlerquellen bei der Auswertung der PCR vermieden.

Allerdings hat die real- time- PCR am LightCycler auch Nachteile. Bei einer solch sensitiven Konzentrationsmessung müssten die Ausgangsbedingungen für alle Proben

identisch sein. Allerdings war die Qualität der Blutproben aufgrund verschieden langer Lagerzeiten uneinheitlich und es lagen Unterschiede in der Zahl der in den Blutproben enthaltenen Zellen vor. Weiterhin traten eventuell Schwankungen in der Erythrozytenlyseeffizienz und der Effizienz der Markierung der Zellen mit magnetischen Partikeln vor der magnetischen Separation auf. Sicherlich wurden auch einige Zellen im Zuge der Separation zerstört. Die Anzahl an Zellen, die diesen Schritt überleben, ist patientenabhängig und schwankt somit von Probe zu Probe. Weiterhin besteht bei Volumina von 1µl die Gefahr, dass die Probenvolumina variieren. Eine Voraussetzung für vergleichbare Ergebnisse ist daher ein absolut korrektes Pipettieren. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Methode zu sensitiv sein könnte. Es gibt sehr viele Pseudogene, die durch den LightCycler ebenfalls detektiert werden, im Organismus aber keine Funktion haben.

Für die Proteinuntersuchungen wurde die Methode der SDS- Page mit anschließendem Western Blot genutzt. Dies ist eine effiziente Methode, Proteine zu untersuchen, hat allerdings auch einige Nachteile. Zunächst beträgt das Probenvolumen 30µl, wodurch nicht sehr viele verschiedene Untersuchungen einer Probe möglich sind. Außerdem ist es schwierig, mit dieser Methode sehr geringe Konzentrationen nachzuweisen: Oft lagen in den Proben nur sehr geringe Proteinkonzentrationen vor. Um die Proteinkonzentrationen der Proben zu erhöhen, wurde die Puffermenge am Ende der Proteinisolation halbiert. Trotzdem hätte teilweise mehr als die größtmögliche Menge von 30µl in die Taschen der SDS- Page gegeben werden müssen, um eine einheitliche Proteinmenge von 50µg zu erhalten. Weiterhin ist diese Methode stark abhängig von der Qualität und Spezifität der eingesetzten Antikörper und der Qualität der Blotmembran. Auffällig war, dass die Proben 17 bis 21 für die BMP2, BMPR-II und CK19 Proteine sehr geringe Konzentrationen aufwiesen. Dies könnte sich dadurch erklären, dass diese Proben gemeinsam in einem Western Blot untersucht wurden. Eventuell lag hier ein Membranfehler oder ein Fehler im Chemolumineszenz- Verfahren vor.

In einigen Fällen waren nur sehr schwache Banden sichtbar; hier war die Auswertung mit dem Programm AIDA sehr subjektiv und der Fehler bei der Konzentrationsbestimmung dementsprechend groß. Die Auswertung mit AIDA erfolgt densitometrisch, das heißt, der Schwärzungsgrad der Banden wird gemessen. Dabei trat das Problem auf, dass einige Konzentrationen so hoch waren, dass eine weitere Schwärzung nicht möglich war und somit von AIDA zu niedrige Konzentrationen errechnet wurden.

Zunächst sollen hier nun die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellseparation, Aktin und CK19 diskutiert werden, um dann auf das Hauptanliegen der Arbeit, BMP2 und die Komponenten seines Signalweges, BMPR-II und Smad4, zu sprechen zu kommen. Am Schluss soll auf die Zusammenhänge mit den Hormonrezeptoren ER, PR und Her2/neu eingegangen werden.

Bei der Zellseparation wurden die Zellen in Positiv- und Negativfraktionen aufgeteilt. Idealerweise sollten sich die Tumorzellen in der Positivfraktion und die weißen Blutzellen in der Negativfraktion sammeln. Die Realität sah anders aus: in beiden Fraktionen lag ein Gemisch aus Tumorzellen und Leukozyten vor.

Es ist auffällig, dass, bis auf vier Ausnahmen, bei allen Proben von Patientinnen die Negativfraktion eine sehr viel höhere Zellzahl aufwies als die Positivfraktion. Die vier Ausnahmen wiesen keinerlei klinische Unterschiede zu den anderen Proben auf, einzig fällt auf, dass die Zellzahlen bei drei dieser vier Proben sehr klein sind.

Der Anteil an Zellen in der Positivfraktion an der Gesamtzellzahl betrug in den Patientinnenproben durchschnittlich 21%. Dies erklärt sich dadurch, dass die sich in der Negativfraktion befindlichen weißen Blutzellen in größerer Anzahl im Blut vorhanden waren als die Tumorzellen, die sich in der Positivfraktion befanden. Weiterhin stellte sich bei Untersuchungen am LSC heraus, dass sich in der Positivfraktion mit 23,2% ein höherer Anteil an Tumorzellen befand als in der Negativfraktion mit 6,8%. Dies zeigt, dass die Separation mittels magnetischer Partikel erfolgreich war.

Auch bei den gesunden Probandinnen befanden sich in der Negativfraktion jeweils mehr Zellen als in der Positivfraktion, hier lag der Anteil der Zellen in der Positivfraktion im Vergleich zur Gesamtzellzahl bei 15%. Das zeigt, dass bei den Probandinnen weniger Zellen in der Positivfraktion vorhanden waren als bei den Patientinnen. Dass überhaupt Zellen aus dem Blut gesunder Probandinnen in der positiven Tumorzellfraktion zu finden waren, könnte zum Einen an einer unspezifischen Bindung von Magnetitteilchen an weiße Blutzellen liegen, zum Anderen an einer unzureichenden Elution der Zellen aus der magnetischen Säule.

Da die Zellzahlen so stark schwankten, war zu erwarten, dass auch die absoluten Konzentrationswerte der zu untersuchenden RNA und Proteine gleichermaßen schwankte. Um diese Ungleichheiten aufzufangen, musste ein Vergleichswert geschaffen werden. Dies hätte entweder die Zellzahl, oder ein Housekeeping- Gen sein

können. Als solches wurde Aktin gewählt, da es von den Zellen stabil und konstant gebildet wird und verglichen mit anderen Housekeeping- Genen von Zellen der Brustdrüse die höchste Konzentration aufweist (Vandesompele et al. 2002). Es variiert zwar zwischen den Brustkrebszelllinien, hat aber eine geringere Variabilität als andere Housekeeping- Gene. Außerdem ist die Zuverlässigkeit von Aktin sehr hoch (Morse et al. 2005). Zunächst wurde nun überprüft, ob Aktin tatsächlich von allen Zellen in gleicher Konzentration exprimiert wurde. Dabei fiel auf, dass sowohl die Aktin- RNA- als auch die Aktin- Proteinkonzentration um mehrere Zehnerpotenzen schwankte. Dies deutet aber nicht darauf hin, dass Aktin als Housekeeping- Gen ungeeignet ist, sondern lässt sich durch die Methodik der cDNA- Synthese und der SDS- Page erklären. Dadurch, dass in den Proben nur sehr wenig RNA und Proteine vorhanden waren, konnte bei der cDNA- Synthese keine einheitliche RNA- Menge von 1µl eingesetzt und bei der SDS- Page keine einheitliche Proteinmenge von 30µg erreicht werden. Daher schwanken die Aktin- Konzentration und auch die Konzentrationen der anderen zu bestimmenden RNA und Proteine sehr stark. Damit erklärt sich auch, dass die Zellzahl als Standard für diese Arbeit ungeeignet war, da in dem Fall eine konstante Aktin- Konzentration hätte vorliegen müssen. Um die starken Konzentrationsschwankungen also ausgleichen zu können, wurde die Aktin- Konzentration als Vergleichswert gewählt.

Damit ergaben sich für alle weiteren Untersuchungen jeweils zwei Werte für die Konzentrationen: ein absoluter Wert so wie ihn der LightCycler für die RNA bzw. AIDA für die Proteine berechnet hatte und ein relativer, auf Aktin abgeglicher Wert.

Für Aktin selbst lagen verständlicherweise nur absolute Werte vor: In 19 von 21 Patientinnen- Fällen lag die Konzentration der Aktin- RNA in der Negativfraktion höher als in der Positivfraktion, was sich durch die höhere Zellzahl in der Negativfraktion erklären lässt. Bei den Proteinuntersuchungen zeigte sich jedoch, dass es keinen Unterschied der Aktinkonzentration zwischen Positiv- und Negativfraktion gab, obwohl die Zellzahlen auch hier in der Negativfraktion viel höher waren als in der Positivfraktion. Dies könnte am Auswertungsprogramm AIDA liegen: die Konzentrationen wird anhand der Schwärze der Proteinbanden gemessen. Eventuell ist hier der Fall eingetreten, dass die Konzentrationen so hoch waren, dass sich kein Unterschied mehr im Schwärzungsgrad der Banden und somit in den berechneten Proteinkonzentrationen ergeben konnte. Hieraus ergibt sich das Problem, dass Aktin als Vergleichsprotein für alle anderen zu bestimmenden Proteine gelten sollte. Da aber schon die

Aktinkonzentrationen zum Teil eventuell fehlerhaft und widersprüchlich zu den RNA-Ergebnissen sind, müssen auch alle anderen auf Aktin abgeglichenen Proteinkonzentrationen sehr kritisch betrachtet und Widersprüche zu RNA-Ergebnissen dementsprechend bewertet werden.

CK19 ist ein Intermediärfilamentprotein, wird in allen epithelialen Geweben, in Brustkrebszellen, aber auch in gesundem Brustepithel gebildet und ist verantwortlich für Invasivität und Zellwanderung (Bostick et al. 1998, Brotherick et al. 1998, Zhang et al. 2004). Außerdem ist es ein epithelialer Marker und dient der Detektion von disseminierten Brustkrebszellen im Blut. Nun könnte angenommen werden, dass im Blut von gesunden Probandinnen kein CK19 nachzuweisen sein dürfte. Tatsächlich fanden sich aber in allen Proben der Gesunden CK19- RNA und -Proteine. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der Venenpunktion Hautzellen in die Blutprobe gelangt sein könnten, obwohl die ersten zwei Milliliter Blut jeweils verworfen wurden. Die Hautzellen sind epithelial und enthalten somit auch den epithelialen Marker CK19 (Stathopoulou et al. 2003). Weiterhin gibt es CK19- Pseudogene, die durch die PCR am LightCycler und den Western Blot ebenfalls detektiert worden sein könnten (Bostick et al. 1998, Stathopoulou et al. 2003). Speziell beim Western Blot könnte es sein, dass der eingesetzte Antikörper nicht spezifisch genug war, denn auch Lymphozyten exprimieren Cytokeratine, die eventuell mit dem CK19- Antikörper reagiert haben könnten. Außerdem könnte es sein, dass geringste Mengen an CK19 physiologischerweise im Blut eines jeden Menschen vorkommen, z. B. als versehentlich transkribierte mRNA (Bostick et al. 1998). Durch die sehr sensitiven Methoden wurden diese kleinsten Mengen ebenfalls detektiert. Dies scheint vor allen Dingen dann plausibel, wenn man die absoluten CK19- Konzentrationen der Probandinnenproben mit denen der Patientinnenproben vergleicht. Hier fällt auf, dass in den Patientinnenproben eine insgesamt 30 Mal höhere CK19- RNA- Konzentration vorliegt als in den Probandinnenproben und eine insgesamt neun Mal höhere Proteinkonzentration. Auch die relativen, auf Aktin abgeglichenen Werte liegen in den Patientinnenproben signifikant höher als in den Probandinnenproben (p- Wert 0,015 für Proteine). Dies zeigt, dass CK19 trotz geringer Expression in Blutproben von gesunden Probandinnen ein guter Marker für disseminierte Brustkrebszellen ist. Es sollte allerdings ein Konzentrationswert als Schwellenwert gewählt werden, der oberhalb der CK19- Konzentrationen der Proben der gesunden Probandinnen liegt.

Nun wurden die Tumorzellfraktionen (Positivfraktionen) der Patientinnen mit den Fraktionen der weißen Blutzellen (Negativfraktionen) bezüglich ihrer relativen CK19-RNA- und Proteinkonzentrationen verglichen. Hier fällt auf, dass im Falle der RNA in den Positivfraktionen viel mehr CK19 vorhanden war als in den Negativfraktionen. Dieses Ergebnis erzielte statistische Relevanz mit einem p-Wert von 0,001. Hier ergibt sich also eine Übereinstimmung mit den Arbeiten von Stathopoulou, Bostick und Brotherick, die herausfanden, dass CK19 in Brustkrebszellen erhöht ist (Bostick et al. 1998, Brotherick et al. 1998, Stathopoulou et al. 2003). Leider ließ sich dieses Ergebnis für die Proteinproben nicht wiederholen, hier trat der entgegen gesetzte Fall ein: Die CK19- Proteinkonzentration war in der Negativfraktion signifikant höher als in der Positivfraktion (p-Wert 0,051). Dies lässt sich durch die Methode des Nachweises erklären. Der CK19- Nachweis mittels Western- Blot gestaltete sich äußerst schwierig, sodass stets nur sehr schwache Banden zur Auswertung zur Verfügung standen. Dadurch wurde der subjektive Fehler wahrscheinlich zu groß, um verwertbare Ergebnisse zu bekommen. Weiterhin könnte der eingesetzte Antikörper zu unspezifisch gewesen sein und mit anderen Cytokeratinen, die von Lymphozyten produziert werden, reagiert haben. Außerdem liegen hier relative, also auf Aktin abgeglichene Werte vor. Wie oben beschrieben gab es aber schon beim Aktinnachweis Differenzen zu den RNA-Ergebnissen. Das Ergebnis des CK19- Proteinnachweises und auch die zufällig entstandene Signifikanz sollten also sehr kritisch betrachtet werden.

Als zusätzliches Ergebnis zeigte sich, dass CK19- Proteine signifikant vermehrt in Her2/neu- positiven Krebsproben exprimiert wurden (p- Wert 0,001). Dieses Ergebnis stimmt mit der Arbeit der Arbeitsgruppe Zhang überein: Hier wurde gezeigt, dass hohe Konzentrationen an Her2/neu mit hohen CK19- Konzentrationen einhergehen. Damit könnte die Rolle von CK19, die Tumorentwicklung zu höherer Aggressivität anzuregen, unterstützt werden (Zhang et al. 2004).

Weiterhin wurde in Proben von Patientinnen mit höheren Tumorstadien signifikant mehr CK19 gebildet als in Proben mit niedrigeren Tumorstadien (p- Wert 0,052). Auch dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass CK19 zu einer höheren Aggressivität der Tumoren beiträgt.

BMP2 werden in der Literatur kontroverse Rollen bezüglich der Tumorgenese zugewiesen. Es gibt sowohl Arbeitsgruppen, die einen tumorfördernden Effekt von BMP2 nachgewiesen haben (Langenfeld und Langenfeld 2004, Clement et al. 2005) als auch solche, die BMP2 eher tumorsuppressive Eigenschaften zuweisen (Reinholz et al. 2002, Yamamoto et al. 2002, Bobinac et al. 2005). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die relative (auf Aktin abgeglichene) RNA- Konzentration von BMP2 in den Positivfraktionen der Patientinnen signifikant höher lagen als in den Negativfraktionen (p- Wert 0,01). Die disseminierten Tumorzellen exprimieren also BMP2, genauso wie die soliden Brusttumoren und Mammakarzinomzelllinien (Clement et al. 2005). Weiterhin ist die absolute BMP2- RNA- Konzentration in den Patientinnenproben durchschnittlich 22 Mal höher als in den Proben der gesunden Probandinnen und auch relativ liegt die BMP2- RNA- Konzentration bei den Patientinnen signifikant höher als bei den Gesunden (p- Wert 0,008). In der Statistik zeigte sich außerdem, dass bei hohem T- und N- Status (p- Werte 0,004 (T) und 0,001 (N)) und fortgeschrittenen Stadien der Tumorerkrankung (p- Wert 0,002) eine höhere BMP2- RNA- Konzentration vorliegt als in weniger fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Auch auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass BMP2 in Proben von Patientinnen signifikant mehr gebildet wird als in Proben von gesunden Probandinnen (p- Wert 0,011). Hier fiel in der Statistik weiterhin auf, dass ein niedriger Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus mit erhöhten BMP2- Proteinkonzentrationen einhergeht (p- Werte 0,005 (ER) und 0,031 (PR)). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch in einer anderen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe (Dissertation Steinert, 2008). Dies könnte die schlechtere Prognose von ER- und PR- negativen Tumoren erklären. Erwähnt werden soll auch, dass auch ein hohes Grading mit erhöhten BMP2- Konzentrationen zusammenzuhängen scheint, obwohl hier ganz knapp keine Signifikanz erzielt werden konnte (p- Wert 0,054). All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BMP2 eine große Rolle in der Tumorgenese spielt und bezüglich der disseminierten Tumorzellen kein Tumorsuppressorgen ist. Gerade der Zusammenhang der erhöhten BMP2- Konzentration mit erhöhtem TNM- Status und Tumorstadien, sowie mit einem hohen Grading und wenig exprimierten Östrogen- und Progesteronrezeptoren unterstützt diese These.

Allerdings ergab sich bezüglich der BMP2- Proteinkonzentrationen, dass in den Negativfraktionen der Patientinnen mehr BMP2 gebildet wurde als in den Positivfraktionen. Dies steht im Widerspruch zu den RNA- Ergebnissen. Auch hier könnte wiederum die Erklärung sein, dass die relativen Konzentrationen durch einen

Abgleich mit Aktin berechnet wurden, mit all den oben beschriebenen Folgen. Ein anderer Ansatz zur Erklärung der Differenzen zwischen mRNA- und Proteinkonzentration von BMP2 könnte sein, dass dieses Protein sehr instabil ist. Es wird schnell degradiert, die Halbwertszeit beträgt etwa 70 Minuten, und damit könnte es sich dem Nachweis entziehen. Daher sollte dieses Ergebnis sehr kritisch betrachtet und nicht als Unterstützung der These von Reinholz und Yamamoto, BMP2 sei ein Tumorsuppressorgen, gewertet werden.

BMP2 bindet an den Rezeptor BMPR-II und setzt damit die Signaltransduktion in Gang. Ohne den Rezeptor gibt es kein BMP2- induziertes Tumorstadium (Pouliot et al. 2003). Da der BMPR-II also eine wesentliche Rolle für die Wirkung von BMP2 spielt, sollte auch er in dieser Arbeit untersucht werden. Leider ergaben sich sowohl in der RNA- als auch in der Proteinuntersuchung bei Patientinnen- wie bei gesunden Proben uneinheitliche Ergebnisse und starke Schwankungen der Konzentrationen. Bei der RNA-Untersuchung zeigten sich keine Banden auf dem Agarosegel. Mögliche Ursachen hierfür könnten sein, dass teilweise falsche Sequenzen amplifiziert worden sein könnten, dass eine unspezifische Bindung von SYBR- Green während der PCR am LightCycler zu unspezifischer Fluoreszenz geführt hat oder dass eventuell zu wenig RNA für einen Nachweis vorhanden war. Für die uneinheitlichen Proteinergebnisse könnte eine zu geringe Menge an BMPR-II- Protein verantwortlich sein, denn es zeigten sich im Western Blot nur sehr schwache Banden, die sich nicht mit AIDA auswerten ließen. Da die Konzentrationen so starken Schwankungen unterlegen waren, wurde für den BMPR-II keine Statistik durchgeführt.

Dieses uneinheitliche Ergebnis ist eventuell ein Zeichen dafür, dass disseminierte Zellen von Mammakarzinomen überhaupt kein BMPR-II exprimieren. Sie befinden sich größtenteils in der G0- Phase (Bozionellou et al. 2004) und könnten somit unempfindlich gegen BMP2 und andere Wachstumsfaktoren sein. Denn, wenn der BMPR-II funktionsuntüchtig ist, bzw. wenn gar kein BMPR-II vorhanden ist, ist eine Wirkung von BMP2 nicht möglich (Pouliot et al. 2003). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die disseminierten Tumorzellen soviel BMP2 sezernieren, dass hier eine Downregulation des BMP2- Rezeptors vorliegt.

Als letzter untersuchter Teil des BMP2- Signalweges soll nun Smad4 besprochen werden. Es bindet als Co- Smad die R- Smads 1,2,3,5,8 oder 9 und ist für die Translokation in den Zellkern verantwortlich (Kusanagi et al. 2000). Es ist in Pankreas- und Kolonkarzinomen mutiert und gilt damit als Tumorsuppressorgen (Dai et al. 1999). Auch beim Mammakarzinom hat es tumorsuppressive Wirkungen. Der Verlust von Smad4 führt zu schnellerem Tumorwachstum und mehr Lymphknotenmetastasen (Xie et al. 2005). Außerdem induziert es die Apoptose in östrogenrezeptorpositiven Zellen (Li et al. 2005). In dieser Arbeit konnte die Annahme der tumorsuppressiven Wirkung von Smad4 unterstützt werden: Die Konzentration von RNA und Proteinen ist jeweils in der Negativfraktion höher als in der Positivfraktion der Tumorzellen, im Falle der RNA erlangt dieses Ergebnis sogar statistische Signifikanz (p- Wert 0,001). Weiterhin wurde Smad4 von den Zellen der gesunden Probandinnen signifikant stärker exprimiert als von den Zellen der Patientinnen (p- Werte 0,029 (RNA) und 0,079 (Proteine)). Außerdem zeigte sich, dass bei einem höheren Grading signifikant weniger Smad4 vorhanden war (p- Wert 0,036). Ebenfalls erwähnenswert ist, dass die Smad4- Konzentration bei hohem Her2/neu- Status niedrig und bei hohem Östrogen- Rezeptorstatus erhöht war (p- Werte 0,031 (Her2/neu) und 0,065 (ER)). Da Smad4 in östrogenrezeptorpositiven Tumoren die Apoptose induziert (Li et al. 2005), könnte dies die bessere Prognose dieser Tumoren erklären. Her2/neu als negativer Prognosefaktor geht dagegen mit niedrigen Konzentrationen des Tumorsuppressors Smad4 einher.

Smad4 spielt aber auch eine Rolle in der Entstehung von Knochenmetastasen. Durch die Hochregulierung von IL11 kommt es über die Aktivierung von Osteoklasten zu osteolytischen Metastasen im Skelettsystem (Kang et al. 2005). Von den Patientinnen, die Proben für RNA- und Proteinuntersuchungen zur Verfügung gestellt hatten, wies nur jeweils eine Skelettmetastasen auf. Bei diesen beiden Proben ließ sich kein Unterschied bezüglich der RNA- oder Proteinkonzentration von Smad4 gegenüber den anderen Proben feststellen. Die Rolle von Smad4 bei der Entstehung von Metastasen konnte folglich anhand dieser kleinen Patientengruppe nicht nachvollzogen werden.

Nach der Einzeldiskussion der RNA- und Proteinkonzentrationen soll nun noch auf den Vergleich dieser Konzentrationen eingegangen werden. Dabei wurden die relativen Konzentrationen beachtet, da die absoluten Konzentrationen aufgrund unterschiedlicher Maßeinheiten nicht vergleichbar waren. Leider ließen sich die Einzelproben nicht vergleichen, weil für eine gleichzeitige Bestimmung von RNA und Proteinen zu wenig

Probenmaterial vorhanden war. Um individuelle Schwankungen weitgehend zu eliminieren, wurden die Mediane der relativen Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen miteinander verglichen. Trotzdem sollten die Ergebnisse aufgrund der kleinen Gruppengrößen (je 21 Patientinnen- und 5 Probandinnenproben für RNA und Proteine) mit Vorbehalten betrachtet werden.

Es zeigte sich, dass die BMP2- RNA- Konzentration in der Positiv- und Negativfraktion der Patientinnen höher war als die Proteinkonzentration. Dies unterstützt die These, dass der mRNA- Gehalt der Zelle nicht mit dem Proteingehalt korreliert und dass BMP2 als Protein sehr instabil ist, eventuell sehr schnell abgebaut wird und sich somit dem Nachweis entzieht. Weiterhin war die Smad4- RNA- Konzentration in der Positivfraktion der Patientinnen höher als die Proteinkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass hier trotz vorhandener RNA wenig Smad4- Proteine vorliegen. Möglicherweise wird in den Tumorzellen die Proteinbildung des Tumorsuppressors gehemmt oder das Protein schnell abgebaut.

Bei den gesunden Probandinnen fiel auf, dass die relative BMP2- RNA- Konzentration in der Positiv- und Negativfraktion nahezu gleich der Proteinkonzentration war. Dies verdeutlicht, dass, wenn keine Tumorzellen vorhanden sind, auch kein Unterschied in der BMP2- Produktion zwischen Positiv- und Negativfraktion vorliegt. Bei Smad4 wurde in der Positivfraktion nahezu gleich viel RNA wie Proteine produziert und in der Negativfraktion mehr RNA als Proteine gebildet, die RNA- und Proteinkonzentration lag dabei insgesamt um ein Vielfaches höher als bei den Brustkrebspatientinnen. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei gesunden Frauen mehr Smad4- RNA zur Proteinproduktion genutzt wird als bei Mammakarzinom- Patientinnen. Auch dies unterstützt die These, dass Smad4 ein Tumorsuppressor ist.

Neben der experimentellen Arbeit wurden auch die klinischen Daten der Patientinnen aus den Akten der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe und des Tumorzentrums der Friedrich Schiller Universität Jena statistisch ausgewertet. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den Hormonrezeptorstatus der Patientinnen und dessen Korrelation mit der Krebserkrankung an sich, dem Krankheitsstadium, dem TNM- Status und dem Alter der Patientinnen gelegt.

Der Östrogenrezeptor wurde in 69% der Fälle, der Progesteronrezeptor nur in 42% exprimiert. Her2/neu war ebenfalls in 42% der Tumoren positiv. Diese Zahlen tendieren in die Richtung der Ergebnisse der Arbeitsgruppen Spyrtos et al. und Chen et al., dass

ER in 71%, PR in 54% und Her2/neu in 30% exprimiert wird (Spyratos et al. 1989, Chen et al. 2003), somit kann die Gruppe der 42 Patientinnen bezüglich des Hormonrezeptorstatus weitgehend als repräsentativ angesehen werden.

Die Patientinnen waren signifikant älter als die gesunden Probandinnen. Dies erklärt sich durch die Wahl der Probandinnen, die alle im Vergleich zu den Patientinnen sehr jung waren. Diese Wahl wurde mit der Begründung getroffen, dass keine der Probandinnen eventuell an Brustkrebs leiden sollte. Die Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung war bei jungen Probandinnen viel geringer als bei älteren Frauen.

Ein weiteres Ergebnis war, dass die Patientinnen gegenüber den gesunden Probandinnen signifikant höhere Werte für den Östrogen- und Progesteronrezeptor, sowie für Her2/neu aufwiesen. Dies liegt einerseits daran, dass bei den gesunden Probandinnen von Rezeptornegativität ausgegangen wurde, bedeutet aber auch, dass, obwohl einige Patientinnen einen negativen Rezeptorstatus bezüglich einem, zwei oder allen drei Rezeptoren hatten, die drei Rezeptoren von den meisten Brustkrebsarten vermehrt exprimiert werden. Dies deckt sich mit Studienergebnissen der Arbeitsgruppen um Frenay, Spyratos und Bonneterre (Bonneterre et al. 1986, Spyratos et al. 1989, Frenay et al. 1991).

Außerdem ergab sich, dass mit höherem Krebsstadium signifikant weniger Östrogen- und Progesteronrezeptoren exprimiert werden (p- Werte 0,08 (ER) und 0,035 (PR)), während der Her2/neu- Status signifikant steigt (p- Wert 0,016). Dieses Ergebnis unterstützt die These der Arbeitsgruppen Berns et al. und Stewart et al., dass Her2/neu- Expression negativ korreliert ist mit dem ER- und PR- Status (Berns et al. 1992) und dass ER- und PR- Positivität ein Indikator für längere krankheitsfreie Intervalle ist (Stewart et al. 1983). Weiterhin wird das Ergebnis von Chen et al., dass Her2/neu die Aggressivität des Tumors fördert, unterstützt (Chen et al. 2003).

Leider ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem TNM- Status der Tumoren nachweisen. Dies deckt sich aber mit dem Ergebnis der Arbeitsgruppe Stewart et al., die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Expression der Hormonrezeptoren und dem Lymphknotenbefall feststellen konnte (Stewart et al., 1993).

Durch die Einteilung der Patientinnen in ER-, PR- und Her2/neu- positive und –negative Gruppen konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression der Rezeptoren und der Produktion von auf Aktin abgeglichenen BMP2, Smad4 und CK19 festgestellt werden. Bei ER- und bei PR- positiven Patientinnen lag auf Proteinebene die Konzentration von

BMP2 und CK19 niedriger als bei negativen Patientinnen, Smad4 hingegen wurde bei rezeptorpositiven Patientinnen vermehrt gebildet. Im Falle von Her2/neu- Positivität wurde mehr BMP2, CK19 und Smad4 gebildet. Da ER- und PR- Positivität ein positiver Prognosefaktor ist (Stewart et al. 1983), war zu erwarten, dass BMP2 und CK19 als Tumorstadiums- fördernde Faktoren hier nur in niedrigen Konzentrationen gebildet werden, Smad4 hingegen als Tumorsuppressor in höherem Maße vorliegt. Her2/neu- Positivität als negativer Prognosefaktor (Chen et al. 2003) geht daher mit hohen Konzentrationen an BMP2 und CK19 einher. Dass Smad4 in diesem Fall auch in höherer Konzentration vorlag als bei Her2/neu- Negativität könnte sich dadurch erklären, dass es neben seiner tumorsuppressiven Wirkung durch die Hochregulierung von IL11 auch Knochenmetastasen und damit die Tumoral aggressivität fördert (Kang et al. 2005).

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Kurz zusammengefasst kann anhand dieser Arbeit festgehalten werden, dass in Blutproben von Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Blutproben mehr CK19, mehr BMP2, und weniger Smad4 nachgewiesen wird. Genauso wird in soliden Tumoren mehr CK19 und BMP2 sowie weniger Smad4 gebildet als in gesunden Gewebeproben. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Fähigkeit der disseminierten Tumorzellen, den Gewebeverbund zu verlassen, im Zusammenhang mit Veränderungen der Expression von CK19, BMP2 oder Smad4 steht.

Diese Aussage sollte in weiteren Arbeiten, in denen Gewebebiopsien und Blutproben derselben Patientin auf die hier untersuchten Proteine getestet werden könnten, verifiziert werden.

Der BMPR-II konnte aufgrund sehr stark schwankender Konzentrationen leider nicht ausgewertet werden. Hier stellt sich die Frage, ob disseminierte Tumorzellen diesen Rezeptor überhaupt exprimieren und ob hier eventuell ein entscheidender Unterschied zu Brustkrebszellen im soliden Tumor vorliegt. Auch diesem Aspekt sollte in weiteren Forschungsprojekten nachgegangen werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

Beckmann MW, Jap D, Kuschel B, Dall P, Lux MP, Hanstein B, Bender HG. 2000. Ovarielle Steroidhormone und Anti-Östrogene: Risiken zur Prävention in der Karzinogenese der Mamma und des Endometrium in der Postmenopause. Geburtshilfe Frauenheilkunde, 60: 77-85.

Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, Van Laere S, van Dam P, Van Marck E, Scharpe S, Vermeulen PB, Dirix LY. 2004. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. Br J Cancer, 91 (10):1813-1820.

Berns EM, Klijn JG, van Staveren IL, Portengen H, Noordegraaf E, Foekens JA. 1992. Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. Eur J Cancer, 28 (2-3):697-700.

Bobinac D, Maric I, Zoricic S, Spanjol J, Dordevic G, Mustac E, Fuckar Z. 2005. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. Croat Med J, 46 (3):389-396.

Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscart R, Demaille A. 1986. Correlation between prolactin receptors (PRL R), estradiol (ER) and progesterone receptors (PgR) in human breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol, 22 (11):1331-1336.

Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, Hoon DS. 1998. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. J Clin Oncol, 16 (8):2632-2640.

Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, Stathopoulou A, Lianidou E, Georgoulas V. 2004. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10 (24):8185-8194.

Brotherick I, Robson CN, Browell DA, Shenfine J, White MD, Cunliffe WJ, Shenton BK, Egan M, Webb LA, Lunt LG, Young JR, Higgs MJ. 1998. Cytokeratin expression in breast cancer: phenotypic changes associated with disease progression. *Cytometry*, 32 (4):301-308.

Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. 2003. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*, 24 (2):218-235.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2 (8):563-572.

Chen JS, Lan K, Hung MC. 2003. Strategies to target HER2/neu overexpression for cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 6 (3):129-136.

Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126 (5):271-279.

Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Hoffken K, Wolft S, Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol*, 27 (2):401-407.

Dai JL, Bansal RK, Kern SE. 1999. G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (4):1427-1432.

Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Lowik C, van der Pluijm G, ten Dijke P. 2006. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res*, 66 (4):2202-2209.

Dillon DA. 2002. Molecular markers in the diagnosis and staging of breast cancer. *Semin Radiat Oncol*, 12 (4):305-318.

Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O. 2003. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol*, 162 (6):1089-1098.

Frenay M, Milano G, Formento JL, Francoual M, Moll JL, Namer M. 1991. Oestrogen and progesterone receptor status in bone biopsy specimens from patients with breast cancer. *Eur J Cancer*, 27 (2):115-118.

Gilboa L, Nohe A, Geissendorfer T, Sebald W, Henis YI, Knaus P. 2000. Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell*, 11 (3):1023-1035.

Hassel S, Eichner A, Yakymovych M, Hellman U, Knaus P, Souchelnytskyi S. 2004. Proteins associated with type II bone morphogenetic protein receptor (BMPRII) and identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4 (5):1346-1358.

Hoock TC, Newcomb PM, Herman IM. 1991. Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J Cell Biol*, 112 (4):653-664.

Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massague J. 2005. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (39):13909-13914.

Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K. 2000. Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell*, 11 (2):555-565.

Langenfeld EM, Langenfeld J. 2004. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res*, 2 (3):141-149.

Li Q, Wu L, Oelschlager DK, Wan M, Stockard CR, Grizzle WE, Wang N, Chen H, Sun Y, Cao X. 2005. Smad4 inhibits tumor growth by inducing apoptosis in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cells. *J Biol Chem*, 280 (29):27022-27028.

Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, 15 (7):3479-3486.

Moren A, Imamura T, Miyazono K, Heldin CH, Moustakas A. 2005. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem*, 280 (23):22115-22123.

Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, Gillies RJ. 2005. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 342 (1):69-77.

Pouliot F, Blais A, Labrie C. 2003. Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res*, 63 (2):277-281.

Pouliot F, Labrie C. 2002. Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1,Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells. *J Endocrinol*, 172 (1):187-198.

Raida M, Clement JH, Ameri K, Han C, Leek RD, Harris AL. 2005. Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death. *Int J Oncol*, 26 (6):1465-1470.

Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. 2002. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat*, 74 (3):255-269.

Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. 2000. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*, 18 (7):1432-1439.

Spyratos F, Hacene K, Tubiana-Hulin M, Pallud C, Brunet M. 1989. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary infiltrating ductal breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1262 patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25 (8):1233-1240.

Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. 2003. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res*, 9 (14):5145-5151.

Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V. 2002. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*, 20 (16):3404-3412.

Steinert S. 2008. Untersuchungen zur tumorbiologischen Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom [Dissertation]. Jena: Friedrich- Schiller- Universität

Stewart JF, Rubens RD, Millis RR, King RJ, Hayward JL. 1983. Steroid receptors and prognosis in operable (stage I and II) breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 19 (10):1381-1387.

Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY. 2007. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol*, 61:570-576

Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, Reiss M. 2002. Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res*, 62 (2):497-505.

Yamamoto T, Saatcioglu F, Matsuda T. 2002. Cross-talk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling. *Endocrinology*, 143 (7):2635-2642.

Zhang DH, Tai LK, Wong LL, Sethi SK, Koay ES. 2005. Proteomics of breast cancer: enhanced expression of cytokeratin19 in human epidermal growth factor receptor type 2 positive breast tumors. *Proteomics*, 5 (7):1797-1805.

Zhang Y, Musci T, Derynck R. 1997. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol*, 7 (4):270-276.

Datenbanken im Internet:

www.genatlas.com

www.google.de

www.rki.de

www.wikipedia.de

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Mehrschrittkarzinogenese des Mammakarzinoms	9
Abbildung 2: Überblick über die TGF- β - Superfamilie.	10
Abbildung 3: Schema der Signaltransduktion der BMPs	14
Abbildung 4: Prinzip der Zellseparation mit dem MACS- System	20
Abbildung 5: Aufbau eines Magnetitteilchens	21
Abbildung 6: Tumorzelle im LSC	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung der PCR mit SYBR Green I	25
Abbildung 8: Amplifikations- und Standardkurve des LightCycler- Systems	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Kontrollfragments	27
Abbildung 10: Western Blot Sandwich	33
Abbildung 11: Prinzip der Darstellung von Proteinbanden	34
Abbildung 12: Agarosegelbilder der cDNA- Analyse von Aktin (712 bp), BMP2 (671 bp), CK19 (425 bp) und Smad4 (243 bp)	41
Abbildung 13: Bilder der Blotmembranen der untersuchten Proteine BMP2, BMPR-II, Smad4, Aktin und CK19	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der Patientinnen	19
Tabelle 2: Benutzte Primer bei der Real- Time PCR.	27
Tabelle 3: Beladungsschema LighCycler	28
Tabelle 4: LightCycler Programme.	28
Tabelle 5: Beladungsschema Agarosegellauf	29
Tabelle 6: Beladungsschema SDS- Page	32
Tabelle 7: Primäre und sekundäre Antikörper zur Proteindetektion	33
Tabelle 8: Einteilung der Werte in Gruppen mit den Werten 0 und 1 zur statistischen Auswertung	35
Tabelle 9: Mittelwerte der Zellzahlen in Positiv- und Negativfraktion und Anteil der Zellen in der Positivfraktion	39
Tabelle 10: Vergleich der absoluten cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	41

Tabelle 11: Vergleich der relativen cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	43
Tabelle 12: Vergleich der absoluten cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	44
Tabelle 13: Vergleich der relativen cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	44
Tabelle 14: Vergleich der Mittelwerte der absoluten RNA- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion	47
Tabelle 15: Vergleich der Mittelwerte der relativen RNA- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion	47
Tabelle 16: statistische Auswertung der relativen RNA- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz	49
Tabelle 17: statistische Auswertung der relativen RNA- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz (Fortsetzung).....	50
Tabelle 18: Vergleich der absoluten Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	52
Tabelle 19: Vergleich der relativen Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	54
Tabelle 20: Vergleich der absoluten Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	55
Tabelle 21: Vergleich der relativen Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	56
Tabelle 22: Vergleich der Mittelwerte der absoluten Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion	58
Tabelle 23: Vergleich der Mittelwerte der relativen Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktion	58
Tabelle 24: statistische Auswertung der relativen Protein- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz	60
Tabelle 25: statistische Auswertung der relativen Protein- Konzentrationen von Patientinnen und gesunden Probandinnen: p- Werte und Beurteilungen der Signifikanz (Fortsetzung).....	61

Tabelle 26: Vergleich der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen der Patientinnenproben	62
Tabelle 27: Vergleich der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen der Probandinnenproben.....	63
Tabelle 28: Vergleich der Mediane der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen von Östrogenrezeptor- positiven und –negativen Patientinnen	64
Tabelle 29: Vergleich der Mediane der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen von Progesteronrezeptor- positiven und –negativen Patientinnen	64
Tabelle 30: Vergleich der Mediane der relativen RNA- und Proteinkonzentrationen von Her2/neu- positiven und –negativen Patientinnen	64

Formel- Verzeichnis

Formel 1: Berechnung der Proteinkonzentration	31
Formel 2: Berechnung des Probenvolumens für die SDS- Page.....	31
Formel 3: Berechnung des Lysepuffervolumens für die SDS- Page.....	31
Formel 4: Berechnung der Aktinkonzentration einer einzelnen Zelle.....	39
Formel 5: Berechnung der relativen cDNA- oder Protein- Konzentration	40
Formel 6: Berechnung eines Faktors zum Vergleich der Patientinnen- und Probandinnen- RNA-Konzentrationen absolut und relativ	47
Formel 7: Berechnung eines Faktors zum Vergleich der Patientinnen- und Probandinnen- Protein-Konzentrationen absolut und relativ	58

Diagramm- Verzeichnis

Diagramm 1: Zellzahlen in Positiv- und Negativfraktionen der Patientinnenproben	37
Diagramm 2: Anteil an Tumorzellen (%) in Positiv- und Negativfraktionen der Patientinnenproben	38
Diagramm 3: Zellzahlen in Positiv- und Negativfraktionen der Probandinnenproben	39
Diagramm 4: Vergleich der absoluten cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	42
Diagramm 5: Vergleich der relativen cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	43

Diagramm 6: Vergleich der absoluten cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	44
Diagramm 7: Vergleich der relativen cDNA- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	45
Diagramm 8: Mittelwerte der absoluten RNA- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktionen	46
Diagramm 9: Mittelwerte der relativen RNA- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktionen	46
Diagramm 10: Vergleich der absoluten Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	53
Diagramm 11: Vergleich der relativen Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Patientinnen- Proben	54
Diagramm 12: Vergleich der absoluten Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	55
Diagramm 13: Vergleich der relativen Protein- Konzentrationen in Positiv- und Negativfraktionen von Proben gesunder Probandinnen	56
Diagramm 14: Mittelwerte der absoluten Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktionen	57
Diagramm 15: Mittelwerte der relativen Protein- Konzentrationen von Patientinnen und Gesunden gesamt, in Positiv- und in Negativfraktionen	57

Übersicht der verwendeten Materialien

Zellseparation

Super Macs Separator	Miltenyi biotech (Bergisch Gladbach)
Erythrozytenlysepuffer	Quiagen (Hilden)
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments (Düsseldorf)
Phosphat- EDTA- Puffer	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Magnetpartikel	Dr. Manuela Schwalbe (Jena), Dr. Norbert Buse, Magnetic Fluids (Berlin)
MS- Separation Column	Miltenyi biotech (Bergisch Gladbach)
LS- Separation Column	Miltenyi biotech (Bergisch Gladbach)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)

LSC

Anti- HEA (EpCAM)- FITC	Miltenyi biotech (Bergisch Gladbach)
CD45- PE	Miltenyi biotech (Bergisch Gladbach)
Menzel- Gläser Polylysine Objektträger	Menzel GmbH & Co KG (Wuppertal)
Fettstift: Liquid Blocker Super Pap- Pen- Mini	SCI Science Services (München)
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments (Düsseldorf)
Phosphat- EDTA- Puffer	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Laser Scanning Cytometer: LSC- 2	CompuCyte Corporation (Cambridge)

Zellzahlbestimmung

Coulter Z2	Beckman Coulter (Krefeld)
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter (Krefeld)

RNA- Isolierung

RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
β- Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich (Steinheim)
70% Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Tischzentrifuge 5417	Eppendorf (Hamburg)

Konzentrationsbestimmung von RNA

Nano Drop ND- 1000	Peqlab (Erlangen)
Ampuwa- Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg)

cDNA- Synthese

Ampuwa- Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg)
5x First Strand Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
0,1M DTT	Invitrogen (Karlsruhe)
Oligo- dT- Primer	Roche Diagnostics (Mannheim)
Random Primers	Invitrogen (Karlsruhe)
Desoxynucleotidtriphosphat (dNTP)- Mix	New England Biolabs (Ipswich)
RNase Out (40 U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)
M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)
Genspezifische 3' Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer MS2 Minishaker	IKA (Staufen)
Brutschrank Typ B 5042E	Heraeus Instruments (Düsseldorf)

Real Time PCR (Light Cyclers)

LightCycler FastStart DNA MasterPlus	Roche Diagnostics (Mannheim)
SYBR Green I Kit	
Genspezifische Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
Glaskapillaren LightCycler Capillaries (20μl)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Kühlblock mit LightCycler Centrifuge	Roche Diagnostics (Mannheim)
Adapters	
Filter Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik GmbH (Oldendorf) Greiner Bio- One (Frickenhäusen)
Vortexer Vortex- Genie 2	Scientific Industries (New York)
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
LightCycler 1.5	Roche Diagnostics (Mannheim)

LightCycler Software Version 3.5	Roche	Molecular	Biochemicals
	(Mannheim)		

Agarosegelelektrophorese

Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)		
TAE Puffer	Siehe Seite 93		
Ethidiumbromid Lösung	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)		
DNA- Ladepuffer	Siehe Seite 93		
1kb DNA- Ladder (Längenstandard)	Invitrogen (Karlsruhe)		
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago)		
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart)		
Gelelektrophorese Apparaturen	Biometra (Göttingen)		
Videokamera-basiertes Computersystem	Amersham	Pharmacia	Biotech
ImageMaster VDS	(München)		

Proteinisolierung

Proteinlysepuffer	Siehe Seite 92
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

Proteinkonzentrationsbestimmung

UV- Spektralphotometer Ultrospec III	LKB Pharmacia (Freiburg)
Plastik- Küvetten	Sarstedt (Nürnberg)
Bradford- Reagenz	Biorad (München)

SDS- Page

4x XT- Sb	Biorad (München)
Proteinlysepuffer	Siehe Anhang
Reducing Agent	Biorad (München)
Kaleidoskop- Marker	Biorad (München)
Cruz- Marker	Santa- Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Laufpuffer	Siehe Seite 92
Fertiggel	Biorad (München)
Gelkammer	Biorad (München)
Netzgerät Power Pac 200	Biorad (München)

Western Blot

TBS 10x	Siehe Seite 93
TBS- T- Waschpuffer	Siehe Seite 93
Blocking Puffer (5% Milchpulver)	Siehe Seite 93
Transferpuffer	Siehe Seite 93
PVDF- Membran	Biorad (München)
Extra thick blot Paper	Biorad (München)
Trans- Blot SD	Biorad (München)
Netzgerät Power Pac 200	Biorad (München)
Primäre Antikörper	Siehe Tabelle 7
Sekundäre Antikörper	Siehe Tabelle 7

Auswertung des Blots

ECL- Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (München)
Spezial- Vernichtungsbeutel CPP	Np Nerbe Plus (Winsen/ Luhe)
Saran Verpackungsfolie	Dow (Schwalbach, Taunus)
LAS 1000	Fujifilm (Düsseldorf)
LAS- Software	Image- Reader LAS- 1000 Pro 2.5 (Fujifilm, Düsseldorf)
Developer	Amersham biosciences (München)
Curix EU Cassette	AGFA (Köln)
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences (München)
AIDA- Auswertungsprogramm Version 3.52.046	Raytest (Berlin)

Statistik

SPSS 13.0 für Windows, Version 13.0.1	SPSS (Chicago)
---------------------------------------	----------------

Lösungen

cDNA- Synthese- Mix

4µl 5x First Strand Buffer

2µl DTT

1µl Random Primer

1µl Oligo- Primer- DT

2µl dNTP- Mix

0,5µl RNase OUT

1µl reverse Transkriptase

Proteinlysepuffer (8ml)

HEPES (pH 7,5) 800µl

NaCl 1200µl

Aqua dest. 2304µl

EDTA 800µl

EGTA 160µl

Triton-X-100 800µl

Na-Pyrophosphat 800µl

Na- Fluorid 800ml

Na-o-Vanadat 160µl

Pepstatin 8µl

Aprotinin 8µl

Leupeptin 8µl

Pefablock 80µl

SDS- Page- Laufpuffer

25ml 20x XT- MES (Biorad)

475ml Aqua dest.

Western Blot

1. TBS 10x

24,2g Tris- Base (Sigma)

80,0g NaCl (Roth)

950ml Aqua dest.

12M HCl (pH auf 7,6)

2. TBS- T- Waschpuffer

100ml TBS 10x

899ml Aqua dest.

1ml Tween20 (Sigma)

3. Blocking Puffer (TBS-T 5%)

5g Milchpulver (Roth)

10ml TBS 10x

90ml Aqua dest.

100µl Tween20 (Sigma)

4. Transferpuffer

3,03g Tris- Base (Sigma)

14,4g Glycin (Roth)

200ml Methanol (99,9%ig, Roth)

2,5ml SDS 20%

auf 1000ml mit Aqua dest. Auffüllen

Agarosegelelektrophorese

1. TAE- Puffer

40 mM Tris- Acetat

1 mM EDTA pH 8,5

2. DNA- Ladepuffer

10 mM Tris- HCl, pH 8,0

1 mM Na₂-EDTA

0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat)

30% Glycerin

0,005% Bromphenolblau

Danksagung

Abschließend möchte ich folgenden Personen danken, die mich bei der Fertigstellung meiner Arbeit unterstützten:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Klaus Höffken, der mir dieses Thema überließ und ohne den die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement, der mir sowohl während der experimentellen Arbeiten als auch bei der Auswertung der Ergebnisse stets mit gutem Rat zur Seite stand.

Prof. Dr. med. Katharina Pachmann, Dr. rer. nat. Manuela Schwalbe, Conny Jörke, Katya Hekimian und allen Mitarbeitern des onkologischen Forschungslabors danke ich für die fachliche und vor allem die moralische Unterstützung, durch die manche Durststrecke überwunden werden konnte.

Ich danke meinem Ehemann Alexander Voigt für viele aufbauende Worte, für fruchtbare fachliche Diskussionen und dafür, dass er immer für mich da war; und meinem kleinen Sohn Johannes dafür, dass er mir mit seinem strahlenden Lächeln immer wieder ganz viel Freude schenkt.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Bruder, die mir immer einen Zufluchtsort boten, an dem ich etwas Abstand und neue Energie gewinnen konnte. Ohne sie wäre dieses Studium und die Dissertation sicher nicht möglich gewesen.

Allen anderen Freunden und Bekannten, die durch verschiedenste Dinge zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ebenfalls danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. biol. hum. J. Clement,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für meine Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12. Februar 2009

Annika Voigt

Lebenslauf

Name: Annika Maria Voigt, geb. Veenker
Anschrift: Käthe- Kollwitz- Straße 16
07743 Jena
Geburtsdatum: 30.06.1982
Geburtsort: Haselünne
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1988 - 1992 Grundschule Holte- Lastrup
1992 - 1994 Orientierungsstufe Holte- Lastrup
1994 - 2001 Kreisdgymnasium St. Ursula Haselünne
Abschluss 2001 mit dem Abitur

Studium:

2001 - 2008 Studium der Humanmedizin an der Friedrich- Schiller- Universität Jena
August 2003 Physikumsprüfung
August 2006 bis Juli 2007 Praktisches Jahr
August 2007 bis Juli 2008 Erziehungsjahr
Oktober 2008 Abschluss mit dem Staatsexamen

Beruf:

Seit Januar 2009 Assistenzärztin der Inneren Medizin an der Helios- Klinik
Blankenhain

Jena, den 12. Februar 2009

Annika Voigt